



Etude de comportement électrique des cellules isolées HEK293 et de leurs agrégats

Amal El Gaddar

► To cite this version:

Amal El Gaddar. Etude de comportement électrique des cellules isolées HEK293 et de leurs agrégats. Autre. Ecole Centrale de Lyon, 2015. Français. NNT : 2015ECDL0008 . tel-01378500v2

HAL Id: tel-01378500

<https://theses.hal.science/tel-01378500v2>

Submitted on 10 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

présentée devant

L'ÉCOLE CENTRALE DE LYON

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Préparée au sein de

**L'ÉCOLE DOCTORALE
ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE
DE LYON**

par

Amal EL GADDAR

**Étude de comportement électrique
des cellules isolées HEK293 et de leurs agrégats**

soutenue le 8 avril 2015 devant la commission d'examen

J U R Y

P. Lévêque	DR CNRS, XLIM	<i>Président</i>
M.-P. Rols	DR CNRS, IPBS	<i>Rapporteur</i>
M. Nadi	Professeur – Université de Nancy	<i>Rapporteur</i>
R. Perrussel	CR CNRS, Laplace	<i>Examineur</i>
M. Frénéa-Robin	Maître de Conférences – UCBL, Ampère	<i>Examinatrice</i>
D. Voyer	Maître de Conférences – ECL, Ampère	<i>Examineur</i>
L. Krähenbühl	DR CNRS, Ampère	<i>Directeur de thèse</i>

Etude de comportement électrique des cellules isolées HEK 293 et de leurs agrégats.

Amal El Gaddar

version modifiée du :
10 septembre 2015

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs Guy Clerc, Directeur du laboratoire AMPERE, François Buret, Directeur adjoint du laboratoire Ampère et Gérard Scorletti, Directeur de l'Ecole Doctorale EEA, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire Ampère. Je souhaite également remercier grandement mon directeur de thèse, Laurent Krähenbühl, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral et pour toute son aide. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de cette thèse.

Mes remerciements vont également à mes encadrant de thèse, Marie Frénéa-Robin et Damien Voyer. Merci à Marie et Damien pour leur conseils, leur investissement dans ce projet, leur patience et également pour leur aide dans la rédaction de ce mémoire. Merci aux membres du jury qui ont bien voulu me consacrer une partie de leur temps : Philippe Leveque, Marie-Pierre Rols, Mustapha Nadi et Ronan Perrussel.

Je remercie également Naoufel Haddour pour toute son aide sur la partie "jonction cellulaire". Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie. Un grand merci à Laure Franqueville et Sébastien Cecillon pour leur aide précieuse sur les cultures cellulaires. Je souhaite également remercier Cremillieu Pierre de l'INL pour m'avoir formé à la fabrication en salle blanche.

Durant ma thèse j'ai aussi effectué des enseignements à l'ECL en génis électrique. Merci à Christian Vollaire et Florent Morel pour leur aide et conseils qui m'ont permis d'effectuer les enseignements avec plus de sérénité. Je remercie tout le personnel du laboratoire Ampère avec qui j'ai partagé ces années de thèse. J'ai une pensée toute particulière pour mes collègues de bureau, Joseph Nesme, Alban Mathieu, Jérémy Pivetal et Eliana Rondon qui sont devenus des amis. Merci pour nos discussions, nos repas et rigolades partagés qui ont toujours rendu mes journées plus agréables.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour mes parents et mon frère qui m'ont toujours soutenu et encouragé tout au long de mon cursus. Mon fils Yanis, qui m'a donné une force incroyable chaque jour au travers de son regard plein d'amour. Enfin, je remercie Sébastien mon époux qui a su me soutenir, me supporter et m'encourager pendant toute la durée de ma thèse et plus particulièrement durant la période de rédaction qui n'a pas toujours été facile. Merci.

Résumé

Le travail rapporté dans ce manuscrit s'inscrit dans la perspective de mieux comprendre les propriétés électriques des tissus biologiques dans la gamme de fréquence allant de 10 kHz à 100 MHz. La connaissance de ces propriétés est essentielle pour évaluer les effets du champ électromagnétique sur le corps humain en cas d'exposition involontaire mais aussi pour diagnostiquer un changement physiologique quand le tissu est exposé volontairement. De nombreux travaux ont été effectués pour mesurer les propriétés électriques des différents tissus mais le comportement électrique relevé n'est pas toujours bien compris en raison de la complexité de la structure du tissu. De plus, on constate une grande variabilité dans les données rapportées dans la littérature. Pour mieux appréhender le comportement électrique du tissu, la démarche originale proposée dans ce manuscrit consiste à partir de l'échelle de la cellule. Ainsi la première partie du manuscrit est consacrée à la caractérisation électrique de cellule humaines de type HEK (Human Embryonic Kidney) par électrorotation. La mise en œuvre de cette technique a permis d'extraire les propriétés électrique de la membrane et du cytoplasme des cellules HEK. La deuxième partie du manuscrit se focalise sur la création d'agrégats de cellules à partir de cellules HEK isolées. Deux techniques ont été essayées. La première s'appuie sur la nature des jonctions intercellulaires. Même si elle donne des résultats, cette approche n'est pas satisfaisante dans la mesure où on ne peut contrôler ni la forme ni la taille des agrégats. L'autre technique consiste à utiliser un champ électrique pour manipuler les cellules par diélectrophorèse. Un microsysteme a été conçu à cet effet avec un réseau d'électrodes quadripolaires. On a ainsi pu obtenir des agrégats permanents de cellules HEK ayant une taille et une forme contrôlée. La dernière partie du manuscrit porte sur l'étude du comportement électrique des agrégats de cellules par le biais de simulations numériques de spectres d'électrorotation. La comparaison du comportement électrique d'une cellule isolée et celui d'un agrégat de cellules montre que le milieu extra cellulaire influe fortement sur la réponse électrique de l'agrégat ; la différence de taille entre les cellules de même que la présence de jonctions intercellulaires ne semblent pas avoir un impact significatif. Ces résultats de simulation devront être appuyés par des études expérimentales.

Mots clés : champs électromagnétique ; électrorotation ; cellules HEK ; agrégats de cellules.

Abstract

The work reported in this manuscript aims at understanding the electrical properties of biological tissues in the frequency range between 10 kHz and 100 MHz. Knowing these properties is essential to assess the effects of involuntary exposure of human body to electromagnetic fields, but also to diagnose a physiological change when the tissue is exposed voluntarily. Many studies have been conducted to measure the electrical properties of different tissues but existing data are not well understood because of the complexity of tissues structure. Moreover, there is considerable variability of data among studies evaluating these properties. To better understand the electrical behavior of tissues, the original approach proposed in this manuscript consists in investigating their properties starting from the cell scale. The first part of the manuscript is dedicated to the electrical characterization of HEK 293 (Human Embryonic Kidney) cells by electrorotation. This technique has been used to extract the electrical properties of the membrane and the cytoplasm of HEK cells. The second part of the manuscript focuses on creating cell aggregates from isolated HEK cells. Two approaches have been proposed. The first one was based on the nature of intercellular junctions. This approach led to the formation of aggregates of irregular size and shape. The other technique consisted in using an electric field to perform dielectrophoresis-assisted cell assembly. A microsystem comprising quadrupole electrodes was designed for this purpose. Permanent aggregates of HEK cells having a controlled size and shape could be obtained using this approach. The last part of the manuscript focuses on study of the electrical behavior of the cell aggregates through numerical simulations of electrorotation spectra. The confrontation between results obtained for a single cell and those obtained for an aggregate tend to show that the extracellular medium influences strongly the electrical response of the aggregate; Conversely, the difference in size between the cells as well as the presence of intercellular junctions does not seem to have had a notable impact. These simulation results will have to be supported by experimental studies.

Keywords : electromagnetic fields ; electrorotation ; HEK cells ; cell aggregates.

Introduction

Notre environnement de vie contient de plus en plus de sources de rayonnement électromagnétique. Cela est dû à la multiplication des réseaux de transport et de distribution d'électricité ainsi qu'aux différents appareils électroniques qui font désormais partie de notre quotidien. Ces champs électromagnétiques interagissent avec leurs environnements et en fonction de leur intensité, ils peuvent s'avérer dangereux pour la santé. L'impact des champs électromagnétiques sur la santé a donc fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques. Depuis des années, biologistes et physiciens associent leurs efforts pour rechercher d'éventuels liens de causalité entre l'exposition aux champs électromagnétiques et certaines maladies telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer et le stress. Parmi les publications parues sur ce sujet, on peut citer le rapport BioInitiative sur les influences des ondes électromagnétiques sur la santé [1]. Ce rapport récapitule le travail d'un groupe de chercheurs internationaux : il répertorie l'ensemble des pathologies et des modifications dans le fonctionnement des cellules potentiellement en rapport avec la présence de champs électromagnétiques. Le Centre International de Recherche sur le Cancer se préoccupe aussi des risques cancérogènes des champs électromagnétiques de radiofréquence. Le Dr Jonathan Samet a affirmé que « les données, qui ne cessent de s'accumuler, sont suffisantes pour conclure à la classification en 2B . Cette classification signifie qu'il pourrait y avoir un risque, et qu'il faut donc surveiller de près le lien possible entre les téléphones portables et le risque de cancer » [2].

De nos jours, il est important de connaître l'influence des champs électromagnétiques sur le corps humain, étant donné que ces champs sont de plus en plus utilisés dans le milieu médical pour le diagnostic comme par exemple en Imagerie par Résonance Magnétique (I.R.M) [3] ainsi que dans certains traitements tels que l'électrochimiothérapie. La spectroscopie de bioimpédance est également utilisée *in vivo* pour analyser de façon non invasive la réponse des tissus à une excitation électrique et permettre ainsi la détection d'éventuelles anomalies. En effet, la spectroscopie de bioimpédance peut être utilisée pour détecter le cancer du sein ainsi que certaines cas d'ischémie. Dans le cas d'ischémie d'un tissu cardiaque, le tissu subit des changements progressifs conduisant à une détérioration irréversible, tels que le gonflement des cellules provoqué par la fermeture des jonctions [4]. Dernièrement, les chercheurs se sont intéressés à de nouvelles applications de la spectroscopie de bioimpédance dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, telles que le contrôle de la conservation

d'organe lors des transplantations, ainsi que le contrôle des cultures cellulaires et de tissus [5].

L'objectif de la thèse est de mieux comprendre le comportement électrique d'un tissu. Pour ce faire, on propose d'établir le lien entre le comportement électrique d'une cellule isolée et celui d'un agrégat de cellules. Cela s'inscrit dans la perspective de comprendre le comportement électrique du tissu. L'idée est de pouvoir établir, à l'avenir, un modèle qui nous permettra de simuler le comportement de tissus épithéliaux exposés à un champ électromagnétique. Ainsi on pourra évaluer l'effet des champs électromagnétiques sur les tissus humains. Afin d'atteindre notre objectif, une caractérisation électrique expérimentale des cellules isolées HEK 293¹ sera effectuée. Ensuite, des agrégats de cellules seront formés à partir de cellules isolées HEK 293. Enfin, le comportement électrique des agrégats de cellules sera étudié par le biais de simulations numériques. Ainsi, nous allons effectuer une comparaison entre le comportement électrique d'une cellule isolée et celui d'un agrégat de cellules. Le résultat de cette comparaison sera analysé et expliqué.

Dans le premier chapitre, les notions de cellule et de tissu seront abordées et nous nous intéresserons à la structure et au comportement électrique d'un tissu biologique depuis l'échelle de la cellule. Nous allons ensuite présenter quelques techniques de caractérisation électrique de cellules et tissus, en mettant l'accent sur deux techniques : l'électrorotation et la spectroscopie de bioimpédance. Les principes théoriques de ces deux techniques seront présentés ainsi que quelques-unes de leurs applications. La dernière partie de ce chapitre est dédiée à l'étude bibliographique des différentes techniques permettant la création d'agrégats de cellules ou de tissus. Cela nous permettra de sélectionner la technique la plus adaptée à notre application qui sera décrite par la suite.

Le deuxième chapitre sera consacré à la caractérisation électrique des cellules HEK 293 en utilisant la technique d'électrorotation. La préparation des cellules HEK ainsi que le banc expérimental dédié à l'expérience d'électrorotation seront décrits. A la fin de l'expérience, une méthode d'analyse des vidéos de rotation de cellules sera présentée. Ces outils vont nous permettre de tracer le spectre d'électrorotation expérimental des cellules HEK. Ce spectre et les équations théoriques de l'électrorotation seront utilisés dans l'identification des paramètres électriques des cellules HEK.

Après avoir caractérisé les cellules HEK dans le deuxième chapitre, le troisième chapitre sera axé sur la formation des agrégats de cellules HEK. Dans ce cadre, deux techniques seront exploitées. La première sera basée sur les jonctions cellulaires, plus précisément la jonction adhérente. Cette jonction permet l'attachement mécanique des cellules entre elles. La deuxième utilisera les forces diélectrophorétiques pour assembler les cellules HEK en agrégats en les repoussant vers les minima du champ électrique par diélectrophorèse négative. Ensuite, en jouant sur les paramètres d'exposition au champ électrique, des agrégats permanents seront obtenus.

1. Lignée cellulaire HEK-293 (Human Embryonic Kidney), issue de tissu épithélial humain.

Le dernier chapitre sera centré sur la compréhension du comportement électrique du tissu du rein d'embryon humain. Pour cela, un ensemble de simulations numériques de spectre d'électrorotation sera effectué. Ces expériences numériques permettront l'étude du comportement électrique d'agrégats de cellules, en introduisant dans la modélisation des hypothèses sur la structure de l'agrégat. Ainsi nous pourrons expliquer la différence entre le comportement électrique du tissu du rein d'embryon humain et celui d'une cellule HEK 293.

Sommaire

1	Bioélectromagnétisme : de la cellule au tissu	8
1.1	La cellule biologique	8
1.1.1	Structure d'une cellule eucaryote	9
1.1.2	Adhérence cellulaire	9
1.1.3	Modèle électrique de la cellule biologique	11
1.1.4	Techniques de caractérisation électrique des cellules	12
1.2	Tissus biologiques	25
1.2.1	Tissu épithélial	25
1.2.2	Jonctions cellulaires	26
1.2.3	Comportement électrique des tissus biologiques	29
1.2.4	Techniques de caractérisation des tissus	31
1.3	Différentes approches de construction tissulaire	36
1.3.1	L'emploi de "structures d'échafaudage" (ou scaffolds)	36
1.3.2	Techniques basées sur une approche "bottom-up"	37
1.4	conclusion	40
2	Caractérisation électrique des cellules HEK par électrorotation	41
2.1	Banc d'expérimentation	41
2.1.1	Microsystème et champ électrique tournant	43
2.1.2	Acquisition et traitement des données	47
2.1.3	Déroulement d'une expérience d'électrorotation	49
2.2	Résultats de mesure	52
2.2.1	Spectre d'électrorotation	52
2.2.2	Identification des paramètres électriques	54
2.3	Etude complémentaire	55
	Appendices	58
3	Formation d'agrégats de cellules HEK	66
3.1	Exploitation de la dépendance au calcium des jonctions adhérentes. .	67
3.1.1	Technique	67
3.1.2	Protocoles développés et résultats	67
3.2	Utilisation du champ électrique	72

3.2.1	Fabrication d'un réseau d'électrodes carrées interdigitées . . .	76
3.2.2	Passage à un système d'électrodes quadripolaires	79
3.2.3	Validation du microsystème utilisé	86
3.3	Conclusion	89
Appendices		90
A Protocoles de photolithographie développés pour les résines S1813, SU8 2035 et la SU8 2010.		91
4	Expériences numériques avec des agrégats de cellules	93
4.1	Comportement électrique attendu d'un agrégat de cellules HEK . . .	93
4.1.1	Propriétés électriques des cellules HEK 293 et du rein	93
4.1.2	Peut-on caractériser un agrégat par électrorotation ?	95
4.2	Modélisation d'un agrégat de cellules HEK	97
4.2.1	Modélisation par éléments finis du microsystème	97
4.2.2	Modèles d'agrégats	101
4.3	Conclusion	110
Appendices		111
B Facteur de Clausius Mossotti en deux dimensions		112
C Fabrication d'un système d'électrodes épaisses pour l'électrorotation		114
C.1	Le cPDMS	114
C.1.1	Les matériaux nanocomposites	114
C.1.2	Préparation du cPDMS	116
C.2	Fabrication des électrodes en cPDMS et intégration dans un système microfluidique	116
C.2.1	Fabrication du moule microstructuré	116
C.2.2	Réalisation des électrodes en cPDMS.	117
C.2.3	Réalisation d'un capot en PDMS intégrant les électrodes en cPDMS.	118
5	Conclusion générale et perspectives	120
5.1	Conclusion générale	120
5.2	Perspectives	122
Bibliographie		126

Chapitre 1

Bioélectromagnétisme : de la cellule au tissu

Les interactions entre le champ électromagnétique et les cellules biologiques intéressent les scientifiques depuis longtemps. Durant le 19ème siècle, Nernst et Tesla se sont attachés à étudier les propriétés électriques des tissus biologiques en basses fréquences. Foster et Schwan, dont les travaux ont contribué à une meilleure compréhension des caractéristiques électriques des tissus et cellules biologiques [6] [7] [8] [9], ont publié les propriétés électriques (conductivité et permittivité électrique) de plusieurs tissus biologiques en fonction de la fréquence [10]. Dans la littérature, on trouve beaucoup d'autres données sur des constituants du corps humain : sang, graisse, matière grise, rein, foie . . . [11] [12] [13]. Les caractéristiques électriques des tissus biologiques sont donc bien connues de nos jours, malgré une grande disparité dans les résultats obtenus. Pour comprendre cette variabilité, il faut s'attarder sur la structure des tissus à l'échelle de la cellule. Si l'on trouve dans la littérature les caractéristiques électriques de cellules isolées [14] [15] [16], peu de travaux ont été menés pour faire le lien avec les propriétés électriques à l'échelle des tissus. Dans ce chapitre, nous décrirons la cellule et le tissu biologique du point de vue de leur structure biologique et de leur caractéristiques électriques. Les différentes techniques de caractérisation électriques seront présentées. Ensuite, nous exposerons quelques techniques permettant de fabriquer un tissu à partir de cellules isolées.

1.1 La cellule biologique

La cellule est la plus petite unité vivante organisée possédant son propre métabolisme. Il existe deux types de cellules : les cellules eucaryotes et les cellules procaryotes. Les cellules eucaryotes (cellules animales et végétales), contrairement aux procaryotes (bactéries), sont composées d'un noyau et d'organites. Nos travaux sont focalisés sur l'étude des cellules eucaryotes, entrant dans la constitution des tissus humains.

1.1.1 Structure d'une cellule eucaryote

La cellule eucaryote est composée principalement d'un noyau et d'un cytoplasme délimité par une membrane (Figure 1.1). Le noyau contient toute l'information génétique de la cellule. Le cytoplasme est un milieu complexe organisé sous forme de compartiments séparés les uns des autres par des membranes internes¹. Chaque compartiment assure des fonctions biologiques particulières. Par exemple, la mitochondrie transforme l'énergie reçue en énergie utilisée par la cellule pour assurer son fonctionnement, tandis que le cytosquelette est indispensable au mouvement et à la division cellulaire. Il y a aussi d'autres compartiments dont le rôle est de synthétiser des protéines et d'assurer leur transport. Pour ce qui est de la membrane cellulaire, elle consiste en une bicouche lipidique non conductrice séparant l'intérieur de la cellule du milieu extérieur. En effet, les phospholipides font de la membrane une structure isolante tandis que les protéines transmembranaires permettent l'échange avec le milieu extérieur. C'est une sorte de barrière qui organise l'échange entre le cytoplasme et le milieu extérieur.

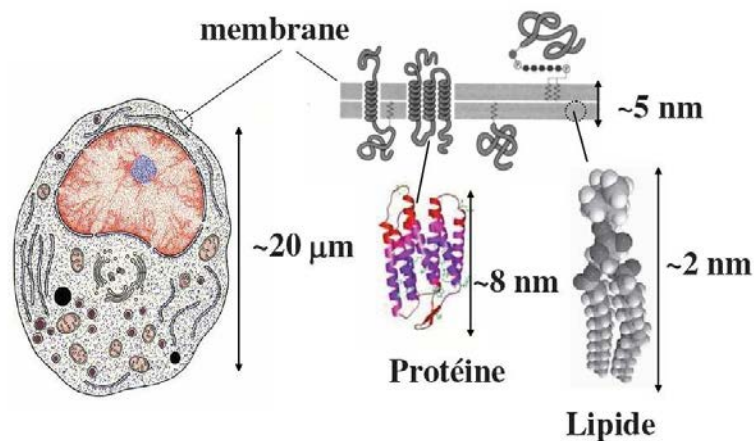


FIGURE 1.1 – La cellule eucaryote [17].

1.1.2 Adhérence cellulaire

L'adhérence cellulaire est un mécanisme très important permettant aux cellules de se relier entre elles ou à la matrice extracellulaire. À travers ces liaisons, les cellules échangent des informations afin d'assurer leur survie ainsi que différentes fonctions comme la prolifération, l'organisation tissulaire et la migration. Cette adhérence cellulaire s'établit grâce aux protéines transmembranaires (Figure 1.2) [18] [19], ces dernières pouvant être divisées en deux catégories :

1. La structure des membranes internes est très proche et peut être comparée à celle de la membrane cellulaire.

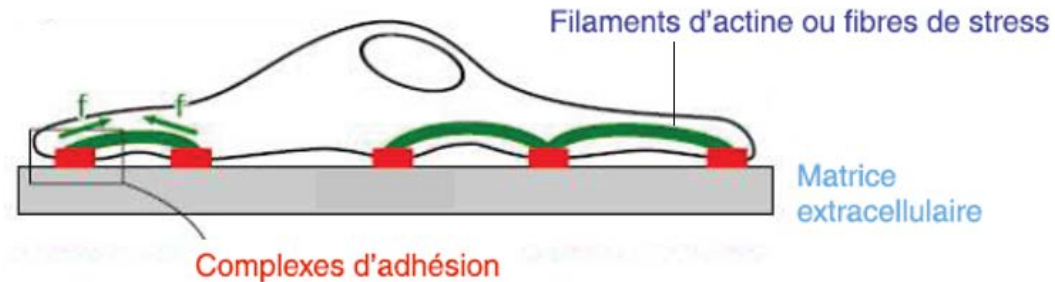


FIGURE 1.2 – Adhérence cellulaire sur la matrice extracellulaire [20].

Les CAM (Cell adhesion molecules)

Ce sont les molécules responsables de la liaison des cellules entre elles. Cette catégorie contient plusieurs protéines parmi lesquelles on peut citer les immunoglobulines et les cadhérines. L'immunoglobuline est une protéine calcium-indépendante qui s'exprime dans une diversité de cellules. Cette molécule peut relier des cellules de même type ou de types différents et joue un rôle important dans la cohésion tissulaire ainsi que dans la communication entre cellules. La liaison induite par la cadhérine dépend du calcium [21] et ne peut être établie qu'entre deux cellules du même type (les interactions de cadhérines sont dites "homophiles"). Elle assure la rigidité du tissu, joue un rôle important dans le transfert des signaux et intervient aussi dans l'organisation des filaments d'actine² [22].

Les SAM (Substrate adhesion molecules)

Ce sont les molécules qui relient les cellules à la matrice extracellulaire. Parmi ces molécules se trouve l'intégrine qui est une protéine calcium-dépendante. L'intégrine fait partie des protéines transmembranaires capables de se lier à plusieurs molécules. Elle peut se fixer sur les protéines de la matrice extracellulaire, comme elle peut interagir avec d'autres molécules d'adhérence comme la cadhérine [23] et les immunoglobulines [24]. Les intégrines jouent un rôle important dans l'adhérence cellulaire et permettent d'établir un échange de signaux entre la cellule et le milieu extérieur [25] [26].

2. Les filaments d'actine sont des protéines issues de la polymérisation de plusieurs unités d'actine. Ils font partie des constituants du cytosquelette et jouent un grand rôle dans le mouvement des organites dans la cellule ainsi que le déplacement cellulaire.

1.1.3 Modèle électrique de la cellule biologique

La présence d'un champ électrique peut perturber le fonctionnement des cellules biologiques. La caractérisation électrique des cellules biologiques est une étape nécessaire à la compréhension des interactions champ électromagnétique/cellule.

Les grandeurs électriques considérées

Pour la caractérisation électrique des cellules biologiques, on s'intéresse essentiellement à deux grandeurs :

1. La conductivité électrique (σ) : cette grandeur représente la capacité d'un milieu à permettre le passage du courant électrique. Autrement dit, elle traduit la capacité de ce milieu à laisser les charges électriques se déplacer librement. C'est l'inverse de la résistivité et son unité est le $S.m^{-1}$ (Siemens par mètre).
2. La permittivité électrique (ϵ) : elle peut être exprimée comme étant le produit de la permittivité du vide ($\epsilon_0 = 8.854187 \cdot 10^{-12} F.m^{-1}$) et la permittivité relative du matériau. C'est une grandeur qui reflète la capacité à polariser un matériau (sous-section 1.1.4).

Le modèle électromagnétique d'une cellule

Le modèle électromagnétique utilisé ici est le modèle proposé par Fear et Stuchly [27]. Dans ce modèle, on considère la cellule biologique comme un matériau hétérogène en deux couches : la première couche est le cytoplasme supposé homogène ; cette couche est entourée d'une deuxième couche plus fine, la membrane également supposée homogène [28]. La figure 1.3 représente le modèle utilisé ainsi que l'ordre de grandeur des paramètres électriques considérés. La membrane et le cytoplasme sont représentés respectivement par une capacité et une résistance. En effet, pour des fréquences inférieures à 10^7 Hz, le cytoplasme est considéré comme un milieu conducteur tandis que la membrane est assimilée à une fine couche isolante [29].

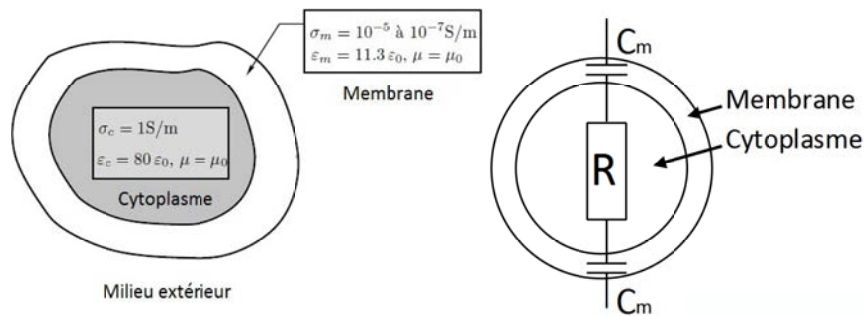


FIGURE 1.3 – Modèle électromagnétique d'une cellule biologique.

1.1.4 Techniques de caractérisation électrique des cellules

La caractérisation électrique des cellules biologiques est généralement réalisée en utilisant deux approches différentes :

- Les techniques électrocinétiques en courant alternatif, utilisées pour étudier le comportement des particules (mouvement / rotation) soumises à un champ électrique alternatif, telles que la diélectrophorèse [30] [31] [32] et l'électrorotation [33].
- La spectroscopie de bioimpédance, qui est une technique utilisée de deux façons différentes : en réalisant une mesure sur toute la suspension cellulaire pour en déduire les caractéristiques d'une cellule [34], ou en ayant recours aux techniques de miniaturisation permettant d'effectuer une mesure sur cellules isolées (microimpédancemétrie).

Les premiers travaux sur les mesures de bioimpédance remontent à l'année 1910 [35], où la conductivité de globules rouges a été mesurée.

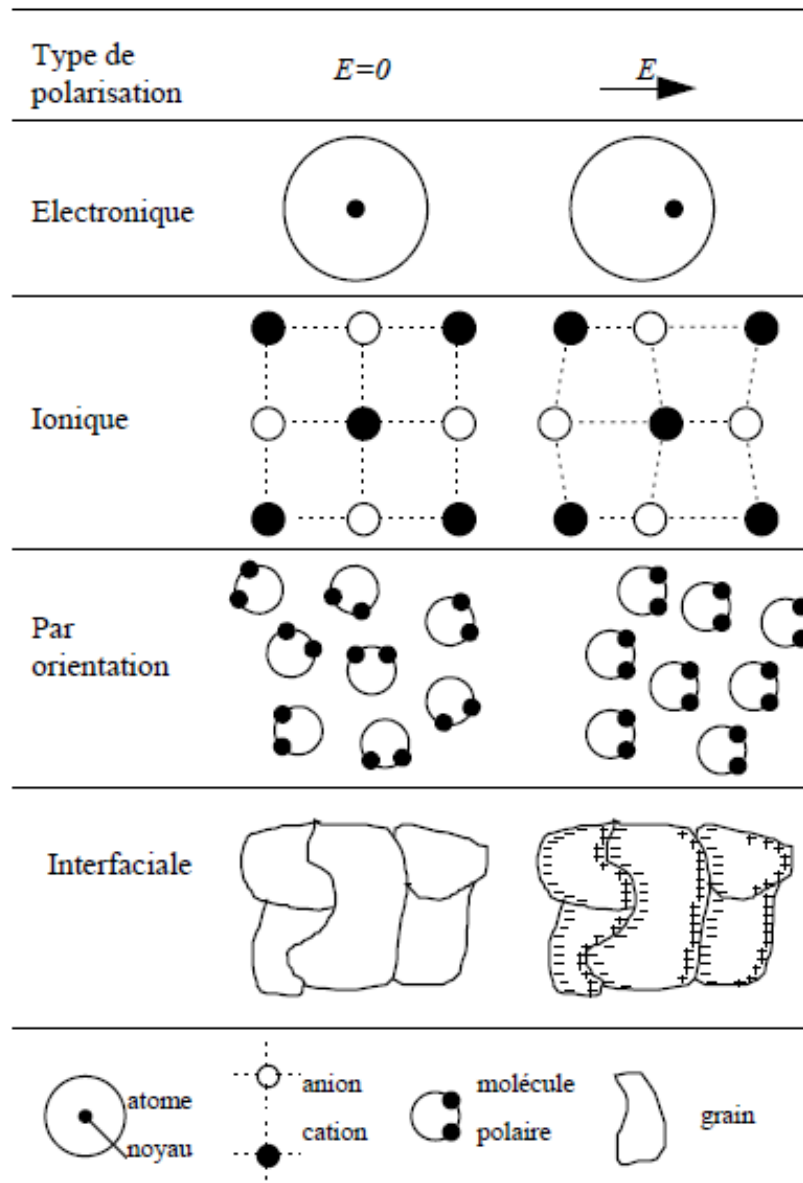
Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à la technique d'électrorotation pour la caractérisation électrique des cellules biologiques isolées.

Electrorotation L'électrorotation est un phénomène qui implique la rotation des particules polarisées sous l'effet d'un champ électrique de module constant tournant à une fréquence imposée par un système de sources électriques de pulsation ω . Placée dans un champ spatialement non uniforme mais de direction fixe, la même particule subirait un mouvement de translation sous l'effet de la diélectrophorèse (DEP). Ces phénomènes électriques proches étant basés sur la polarisation de la matière, il semble important de s'attarder sur cette notion.

Polarisation de la matière La polarisation est un phénomène électrique qui peut être vu comme la création de dipôles électriques. L'application d'un champ électrique implique une modification dans l'organisation des charges à l'intérieur de la matière. Cela se traduit par le déplacement des charges positives et des charges négatives. Il existe différents types de polarisations qui peuvent apparaître à différentes échelles. Au niveau microscopique, on distingue quatre types de polarisation (Figure 1.4).

L'apparition de ces différents types de polarisation dépend fortement de la fréquence du champ électrique appliqué [37] :

- La polarisation électronique se traduit par un léger déplacement du nuage électronique de l'atome par rapport à son noyau. Elle domine pour des fréquences supérieures à 10^{15} Hz.
- La polarisation ionique (ou atomique) se présente sous forme d'un déplacement des ions positifs par rapport aux ions négatifs dans les molécules non polaires, elle dépend donc de la charge des ions ainsi que des forces de liaison ioniques mutuelles. Elle domine pour des fréquences proches de 10^{14} Hz.
- La polarisation par orientation concerne les molécules non symétriques possédant un moment dipolaire permanent (par exemple H_2O). Sous l'effet d'un



Les déplacements des charges sont très fortement exagérés

FIGURE 1.4 – Les quatre types de polarisations microscopiques [36]

champ électrique, ces molécules changent d'orientation et peuvent même être déformées. Les dipôles déjà présents s'arrangent entre eux. Ce type de polarisation peut-être observé jusqu'à des fréquences proches de 10^9 Hz.

- La polarisation interfaciale dite de Maxwell-Wagner apparaît au niveau de l'interface entre deux milieux de propriétés différentes, telles que $\epsilon_1/\epsilon_2 \neq \sigma_1/\sigma_2$. Ce mécanisme de polarisation joue un rôle très important dans les matériaux hétérogènes. Or, comme évoqué précédemment, les deux compartiments qui composent la cellule possèdent des propriétés électriques différentes et se distinguent également de celles du milieu extra-cellulaire. Ainsi, sous l'effet du champ électrique, les porteurs de charges libres présents au niveau du cytoplasme migrent à l'intérieur de la cellule pour s'accumuler sur les parois de la membrane plasmique. Le même phénomène se produit à l'interface entre la membrane et le milieu extra-cellulaire. Ainsi on aura la formation d'un dipôle électrique à l'échelle de la cellule biologique. Dans les tissus biologiques, les effets liés à la polarisation de Maxwell-Wagner se manifestent dans une gamme de fréquences comprises entre quelques dizaines de KHz et quelques dizaines de MHz. La figure 1.5 illustre le phénomène de polarisation interfaciale entre une particule neutre et son milieu de suspension [38].

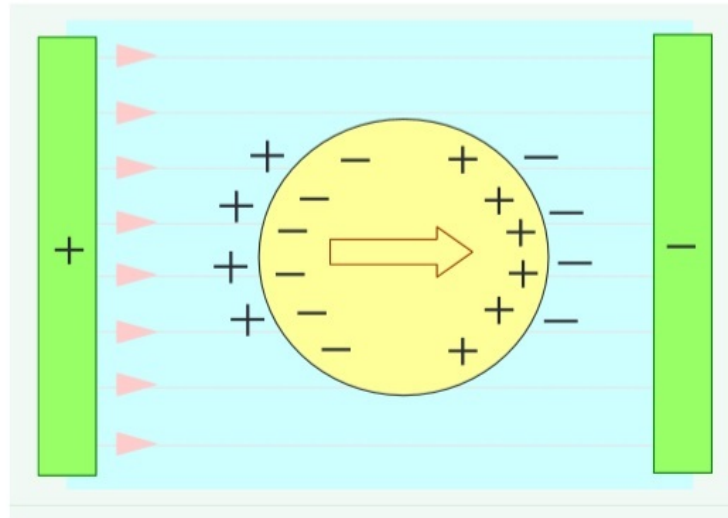


FIGURE 1.5 – Polarisation de Maxwell-Wagner induite dans le cas d'une particule diélectrique neutre placée dans un champ uniforme. Les charges s'accumulent à l'interface particule/milieu de suspension [39].

Par ailleurs, les molécules entrant dans la composition de la membrane cellulaire confèrent à la cellule une charge de surface, attirant les ions de la solution de charge opposée (contre-ions), qui forment une sorte de nuage autour de la cellule. Sous l'effet d'un champ électrique, ce nuage tend à se déformer, ce qui se traduit également par l'apparition d'un dipôle. Ce mécanisme de polarisation intervient aux basses

fréquences, entre quelques hertz et quelques dizaines de kilohertz.

Comme nous le verrons par la suite, la mesure des propriétés électriques de la membrane cellulaire et du cytoplasme peut être effectuée en étudiant le comportement d'une cellule placée dans un champ dont la fréquence varie entre 10^4Hz et 10^8Hz . Dans cette gamme de fréquences, la polarisation de Maxwell-Wagner domine et conduit aux ordres de grandeurs de permittivités indiquées sur la figure 1.3.

Principe de mise en mouvement d'une cellule sous l'effet d'un champ électrique alternatif Les techniques de diélectrophorèse et d'électrorotation nécessitent l'application d'un champ électrique présentant une intensité ou une phase spatialement non uniforme. Dans le cas de la diélectrophorèse, l'application d'un champ électrique non uniforme de direction fixe se traduit par l'apparition de charges opposées en quantités égales de part et d'autre de la cellule, sur lesquelles s'exercent des forces de Coulomb d'intensités différentes, compte tenu du caractère inhomogène du champ. Ce déséquilibre engendre un mouvement de translation de la cellule. La figure 1.6 illustre le comportement d'une particule soumise à la diélectrophorèse positive (DEP positive). En effet, lorsque la particule est plus polarisable³ que son milieu de suspension, elle subit une force nette la dirigeant vers la zone d'intensité de champ électrique maximale. Dans le cas où la particule est moins polarisable que son milieu de suspension, elle se déplace vers le minimum de champ (DEP négative). Une particule chargée (en bleu) se déplace quant à elle vers l'électrode de polarité opposée (flèche hachurée, principe de l'électrophorèse).

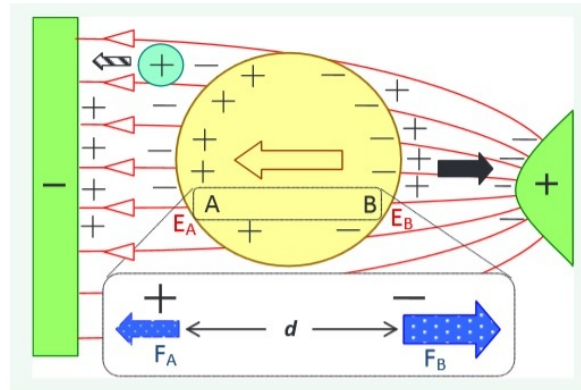


FIGURE 1.6 – Déplacement d'une particule neutre (en jaune) vers le maximum de champ sous l'effet de la diélectrophorèse positive (flèche noire). Si l'on inverse le sens du champ (polarité des électrodes), le signe des charges induites est également modifié et par conséquent le sens du déplacement est inchangé [39].

3. Le nombre de charges à l'intérieur de la particule est supérieur au nombre de charges à l'extérieur de la particule.

L'électrorotation consiste à appliquer un champ électrique tournant d'amplitude constante. Quand on applique un champ électrique, on crée un dipôle au niveau de la particule caractérisé par un moment dipolaire \vec{p} . Cependant, la création de ce dipôle n'est pas instantanée ; ce retard pris par le dipôle pour s'établir se traduit à chaque instant par un angle entre l'orientation du champ électrique et celle du moment dipolaire qu'il induit. La particule subit alors un couple tendant à aligner le moment dipolaire sur le champ, ce qui la fait tourner sur elle-même (un peu à la manière du rotor d'une machine asynchrone) comme l'illustre la figure 1.7.

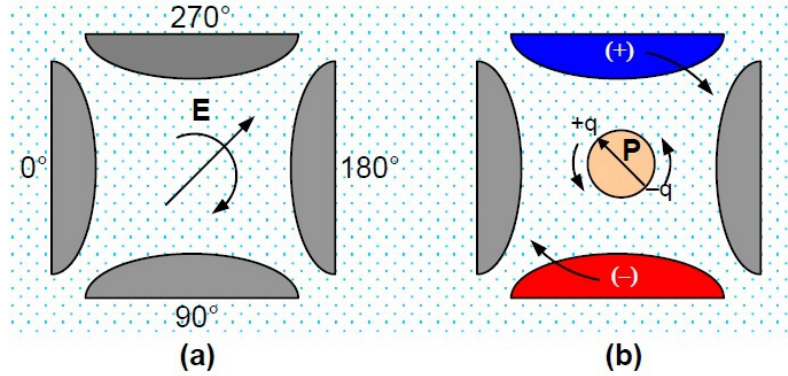


FIGURE 1.7 – (a) Génération d'un champ tournant dans l'espace inter-électrodes en appliquant quatre tensions sinusoïdales en quadrature. (b) La particule tourne dans le sens du champ électrique ou le sens opposé selon le déphasage entre le dipôle induit \vec{P} et le champ électrique [40].

Théorie de l'électrorotation

— a) Cas simple de l'électrorotation d'une sphère :

Dans le cas simple de l'électrorotation d'une sphère, l'expression du moment dipolaire induit par le champ électrique peut se mettre sous la forme suivante [41] :

$$\vec{p} = 4\pi\epsilon_m K(\omega) r^3 \vec{E} \quad (1.1)$$

r , ω et \vec{E} représentent le rayon de la cellule, la pulsation et le vecteur du champ électrique appliqué.

$K(\omega)$ est un nombre complexe défini comme le facteur de Clausius-Mossotti :

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (1.2)$$

$$\epsilon_{p,m}^* = \epsilon_{p,m} - j \frac{\sigma_{p,m}}{\omega} \quad (1.3)$$

ϵ_p , ϵ_m , σ_p et σ_m représentent respectivement la permittivité et la conductivité du milieu d'immersion et de la particule.

- b) Extension à un système à deux sphères concentriques :
Une cellule biologique se rapproche davantage du modèle à deux sphères imbriquées (comme présenté dans la figure 1.3). Dans ce cas, le facteur $K(\omega)$ doit prendre en compte les propriétés électriques du cytoplasme et de la membrane. L'expression de ϵ_p^* , qui représente la permittivité complexe effective de la cellule peut être mise sous la forme suivante [42], [43] :

$$\epsilon_p^* = \frac{(C_m + \frac{G_m}{j\omega})r \times (\epsilon_0\epsilon_{r_c} + \frac{\sigma_c}{j\omega})}{(C_m + \frac{G_m}{j\omega})r + (\epsilon_0\epsilon_{r_c} + \frac{\sigma_c}{j\omega})} \quad (1.4)$$

avec :

- σ_c et ϵ_{r_c} la conductivité et la permittivité relative du cytoplasme.
- G_m ⁴ et C_m ⁵ la conductance et la capacité membranaire spécifiques (par unité de surface).

Le facteur de Clausius-Mossotti qui décrit la polarisation de la particule dépend de la fréquence ainsi que des propriétés de cette particule et de son milieu d'immersion. La figure 1.8 représente l'allure de l'évolution des parties réelle et imaginaire de K en fonction de la fréquence.

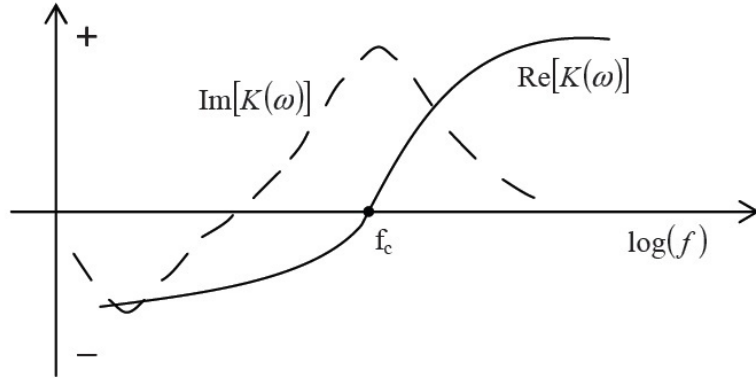


FIGURE 1.8 – Evolution typique des parties réelle et imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence pour une cellule vivante dans un milieu aqueux peu conducteur.

Comme expliqué à la sous-section 1.1.4, la particule subit un couple sous l'effet du champ électrique appliqué. Ce couple peut se mettre sous la forme [44] :

$$\vec{\Gamma} = \vec{p} \wedge \vec{E} = -4\pi\epsilon_m r^3 \text{Im}[K(\omega)] E_0^2 \vec{k} \quad (1.5)$$

4. $G_m = \sigma_m/d$ ($S.m^{-2}$.) où d est l'épaisseur de la membrane, de l'ordre de 5 nm

5. $C_m = \epsilon_m/d$ ($F.m^{-2}$).

Où \vec{k} représente le vecteur unitaire orthogonal au plan dans lequel tourne le champ.

Le sens de rotation des particules peut se déduire de l'expression du couple : quand la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti est négative, les particules tournent dans le même sens que le champ électrique appliqué. Quand elle est positive, les particules tournent dans le sens opposé [45].

En appliquant le principe fondamental de la dynamique aux particules en rotation, on peut déduire la vitesse de rotation des particules [46]. En régime permanent, le couple de rotation est égal au couple de traînée visqueuse (couple de Stokes) :

$$\frac{\partial \Omega}{\partial t} = \sum \Gamma = \Gamma - \Gamma_{Stokes} = 0 \quad (1.6)$$

Le couple de Stokes peut s'exprimer sous la forme suivante :

$$\Gamma_{Stokes} = 8\pi\eta r^3 \Omega(\omega) \quad (1.7)$$

On en déduit l'expression générale de la vitesse de rotation des particules :

$$\Omega(\omega) = -\frac{\epsilon_m \text{Im}[K(\omega)] E_0^2}{2\eta} = -\chi \text{Im}[K(\omega)] (\text{rad.s}^{-1}) \quad (1.8)$$

Avec η la viscosité du milieu d'immersion et χ tel que :

$$\chi = \frac{\epsilon_m E_0^2}{2\eta} \quad (1.9)$$

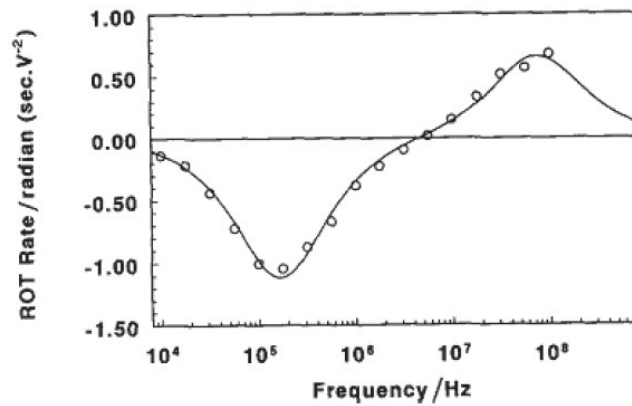


FIGURE 1.9 – Spectre d'électrorotation expérimental (o) et théorique (-) d'une cellule DS19 [46]

Les spectres représentant la vitesse de rotation des particules en fonction de la fréquence sont appelés les spectres d'électrorotation. Ces spectres ont la même allure que l'évolution de la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence. En effet, la vitesse de rotation varie linéairement en fonction de la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti (voir équation (1.8)). La figure 1.9 montre un exemple de spectre que l'on peut trouver dans la littérature. Sur ce spectre on observe deux résonances : la première dite anti-field correspond à la vitesse maximale de la cellule dans le sens opposé à celui du champ, elle intervient en basse fréquence et dépend majoritairement des propriétés de la membrane. La deuxième dite co-field correspond à la vitesse maximale de la cellule dans le sens du champ, elle dépend principalement des propriétés du cytoplasme [47].

SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE La spectroscopie d'impédance est une technique de caractérisation qui consiste à analyser la réponse électrique d'un échantillon donné en régime linéaire. Une tension sinusoïdale $v(t) = V_m \times \cos(\omega t)$ est appliqué à une cellule de mesure (électrodes+échantillon), il en résulte un courant $i(t) = I_m \times \cos(\omega t - f)$. On obtient ainsi une impédance de module $|Z(\omega)| = V_m/I_m$. Les propriétés électriques sont reliées à ces mesures à travers une modélisation de l'échantillon par des circuits linéaires composés de résistances et de condensateurs. Cette technique est largement utilisée pour évaluer l'état des tissus animaux (*in vitro* et *in vivo*) et pour caractériser les tissus biologiques humains [48] [49] [50]. Elle permet aussi l'évaluation quantitative de changements cellulaires tels que la croissance des levures [51].

Dans le cas de la caractérisation électrique des cellules biologiques par spectroscopie d'impédance, le milieu où baignent les cellules fait partie du système à analyser. Étant conducteur, ce milieu interagit avec les électrodes et fait intervenir des éléments supplémentaires dans le modèle équivalent utilisé pour décrire l'impédance du système. En effet, à l'interface électrode-électrolyte, on constate l'apparition de processus de transfert de charges entre les électrons des électrodes et les ions de l'électrolyte, selon deux mécanismes :

1. Un transfert de charge faradique (Figure 1.10). Il s'explique par l'oxydation et la réduction des espèces chimiques dans l'électrolyte qui peuvent avoir lieu durant le transfert des électrons à destination ou en provenance des électrodes. Il se produit une réduction à la cathode et une oxydation à l'anode.
2. Un transfert de charge non faradique dit capacitif (Figure 1.10). Il se traduit par la formation d'une double couche à l'interface électrode-électrolyte et est dû au déplacement des ions de l'électrolyte vers l'électrode. Le transfert de charge non faradique, contrairement au faradique, n'implique pas de transfert d'électrons entre l'électrode et l'électrolyte.

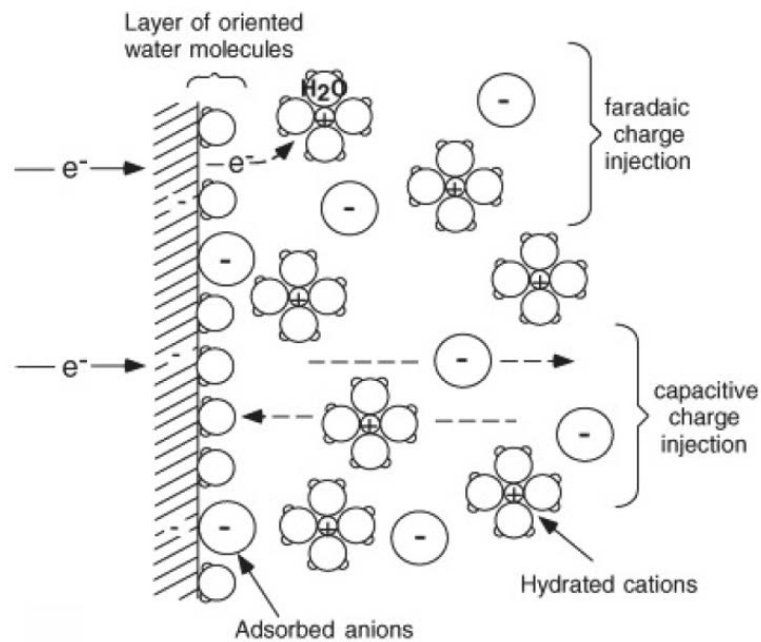


FIGURE 1.10 – Les transferts de charges à l'interface électrode-électrolyte [52].

Le modèle équivalent utilisé pour décrire l'impédance de l'interface électrode-électrolyte, aussi appelé schéma de Randles, est donné figure 1.11. R_e représente la résistance de l'électrolyte, C_d et Z_F sont respectivement les impédances capacitives et faradiques de l'interface. Il est cependant possible de simplifier le modèle de l'interface électrode/électrolyte : quand la fréquence appliquée dépasse quelques kHz [53], on ne considère alors plus que le courant capacitif. La capacité C_d traduisant la formation de la double couche est importante à des fréquences de l'ordre de 10 kHz (Paragraphe 1.1.4).

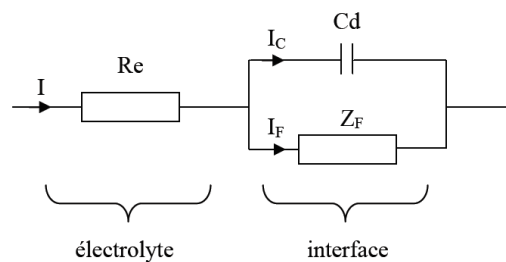


FIGURE 1.11 – Circuit équivalent d'un système électrochimique. (Schéma de Randles)

Microsystèmes dédiés à la caractérisation électrique des particules Le premier cytomètre capable de mesurer les propriétés électriques des particules a été développé par Coulter (1956). Le principe du compteur Coulter est le suivant : deux électrodes sont placées de part et d'autre d'un orifice ; quand une particule passe à travers l'orifice, elle déplace le fluide conducteur et produit un changement d'impédance. Cette variation est mesurée comme une impulsion de courant. Le nombre de changements d'impédance indique le nombre de particules tandis que la valeur de l'impédance mesurée est proportionnelle au volume de la particule. La microimpédancemétrie a connu de nombreuses évolutions depuis le compteur Coulter. En effet, les électrodes de détection placées de part et d'autre de l'orifice ont été remplacées par des microélectrodes intégrées dans les parois d'un microcanal. La première mesure d'impédance de cellule unique a été effectuée par Ayliffe et al. [54] en utilisant un microcanal (10 μm de largeur et 4.3 μm de hauteur) avec des électrodes intégrées en or (8 μm de largeur et 4 μm d'épaisseur). Cette mesure a montré la possibilité d'utiliser la spectroscopie d'impédance afin de différencier deux types cellulaires. La figure 1.12 présente les résultats obtenus sur des granulocytes⁶ humains (human PMNs) et des globules rouges de poissons (fish RBCs).

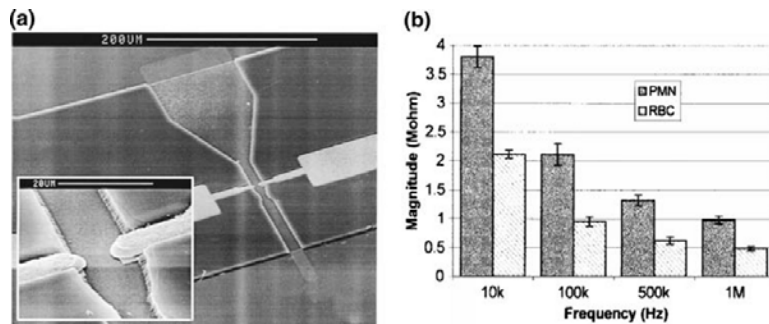


FIGURE 1.12 – a) Le microcanal avec des électrodes intégrées en or dédié à la mesure d'impédance sur cellule unique. b) Le module d'impédance des PMNs humains et RBCs de poissons à quatre fréquences. Cette courbe montre la possibilité de différencier deux types cellulaires à l'aide d'une mesure d'impédance [54].

Au début des années 2000, Gawad et al. [53] ont réalisé une avancée significative dans le domaine de la micro-impédancemétrie. En utilisant un nouveau microsystème, ils ont réussi à faire la première analyse quantitative démontrant la discrimination de deux types de globules rouges (les érythrocytes⁷ et les érythrocytes achromatocytes⁸).

6. Les granulocytes représentent des globules blancs non spécifiques car ils ne sont pas dirigés contre un seul antigène

7. Les érythrocytes sont des globules rouges

8. Erythrocytes qui sont produits normalement, mais détruits, ce qui provoque leur décoloration par perte d'hémoglobine

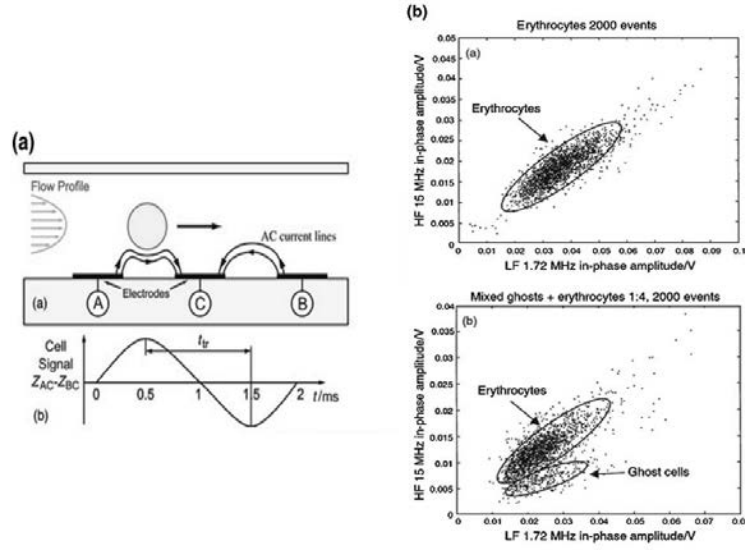


FIGURE 1.13 – a) Une particule dans l’espace interélectrodes du microsystème utilisé, avec un spectre d’impédance caractéristique pour une particule unique. b) Mesure d’impédance pour les érythrocytes et le mélange érythrocytes/érythrocytes achromatocytes [53].

La figure 1.13 représente le dispositif utilisé avec une cellule placée entre les électrodes ainsi que les données d’impédance pour les érythrocytes et pour le mélange érythrocytes/érythrocytes achromatocytes. Les micro-électrodes sont fabriquées avec des dimensions proches de celles des cellules afin d’augmenter la sensibilité de la mesure et sont alimentées par un courant alternatif. Plus précisément, le système comporte trois électrodes de sorte que l’on peut effectuer une mesure différentielle de l’impédance $Z_{AC} - Z_{BC}$. L’intérêt est de s’affranchir du problème à l’interface électrode/électrolyte : on peut alors déterminer plus facilement les paramètres électriques de la cellule en fonction du milieu de suspension. Cependant, dans ces systèmes, les microélectrodes sont coplanaires : la répartition du champ électrique dans le canal n’est pas homogène. Par conséquent, on peut obtenir une mesure d’impédance différente en fonction de la position de la particule dans le canal. La géométrie des électrodes en face-à-face sur les côtés opposés du canal (électrodes parallèles) est a priori plus appropriée pour la mesure d’impédance des cellules individuelles que les électrodes coplanaires. En effet, pour la configuration d’électrodes parallèles, la distribution du champ électrique est moins divergente par rapport à celle des électrodes coplanaires [55]. La figure 1.14 représente le système de détection électrique de cellule unique avec des électrodes parallèles ainsi que le spectre d’impédance caractéristique d’une particule.

Néanmoins, la fabrication d’électrodes parallèles en or dans un microcanal reste

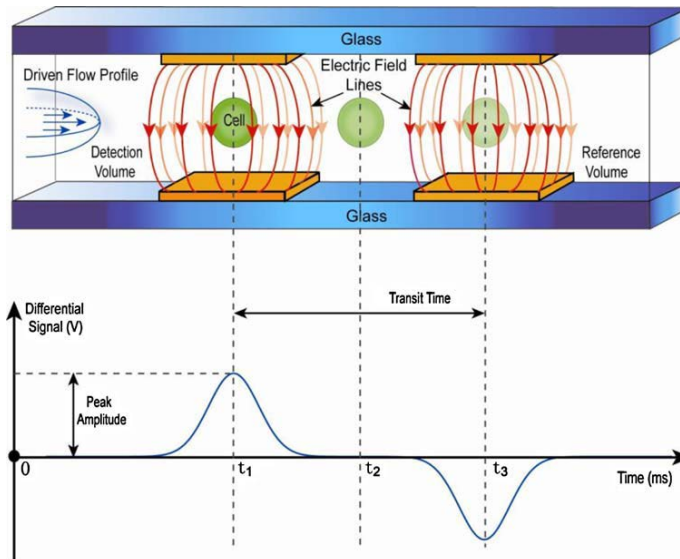


FIGURE 1.14 – Mesure d’impédance de cellules individuelles avec un système muni d’électrodes parallèles [56].

complexe [57]. Pour résoudre ce problème, Gou et al. [58] ont proposé un nouveau microsystème, basé sur l’intégration de deux électrodes en or de part et d’autre d’un microcanal en PDMS⁹. La figure 1.15 montre le principe de fonctionnement de ce microsystème.

La simulation du champ électrique donnée à la figure 1.16 permet de comparer la répartition du champ dans le microcanal pour les deux microsystèmes. On constate que dans le cas des électrodes parallèles, la distribution du champ électrique est assez uniforme, ce qui offre une grande sensibilité lors des mesures. Dans le microsystème présenté par Gou et al., le champ électrique dans le microcanal (fermé) est également relativement uniforme. Ce nouveau microsystème offre donc une bonne uniformité de champ électrique avec une technique de fabrication qui ne semble pas être complexe.

9. Le Polydiméthylsiloxane (PDMS) souvent appelé silicone est un polymère organo-minéral qui contient du carbone et du silicium, c’est un polysiloxane extrêmement flexible et fortement hydrophobe.

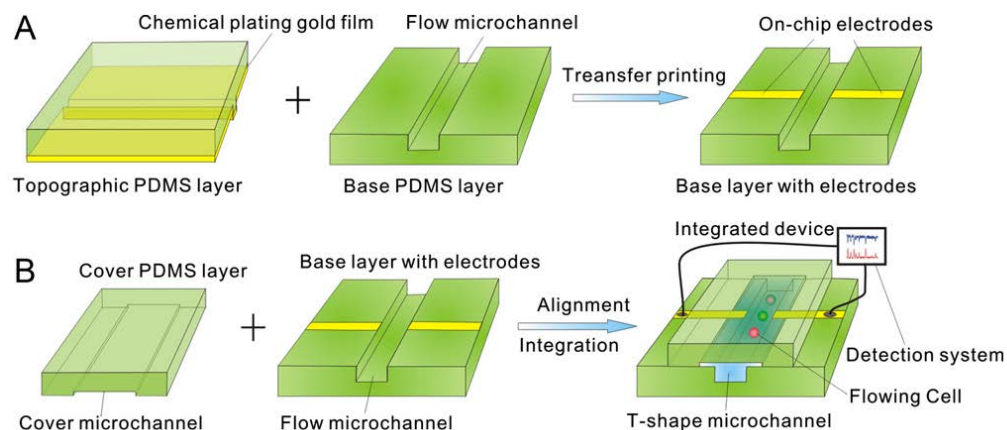


FIGURE 1.15 – A) Procédé de fabrication des électrodes en or sur le microcanal en PDMS. B) Fermeture du microcanal avec un capôt en PDMS [58].

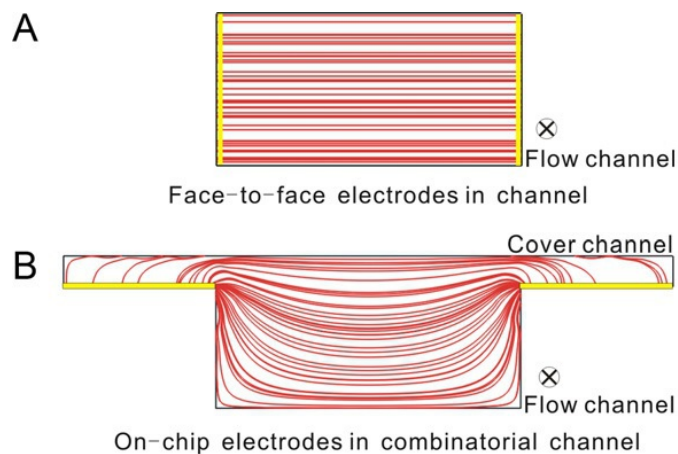


FIGURE 1.16 – Distribution du champ électrique dans un canal fermé (lignes isopotentiellles), pour les deux configurations d'électrodes. (A) Electrodes parallèles. (B) Electrodes intégrées sur le microcanal en PDMS [58].

1.2 Tissus biologiques

Un tissu est un ensemble de cellules de même origine liées entre elles de manière à former une entité morphologique. Ces cellules sont groupées pour assurer une fonction particulière dans le corps humain. Il existe quatre types de tissus : épithélial, conjonctif, musculaire et nerveux (Tableau 1.1).

Tissus épithéliaux	Epithéliums de revêtement (épidermes)
	Epithéliums glandulaires (fonctions sécrétrices)
Tissus conjonctifs	Fibroblastes => réparation de tissu lésé
	Cellules cartilagineuses => cartilage
	Cellules osseuses => cristaux de phosphate de calcium et squelette
Tissus musculaires	Muscle squelettique
	Muscle lisse
	Muscle cardiaque
Tissus nerveux	Traitement et transmission de l'information (nerfs)

TABLE 1.1 – Classification des tissus biologiques

Dans la suite, on s'intéressera plus particulièrement aux tissus épithéliaux car ils présentent une structure relativement simple.

1.2.1 Tissu épithélial

Un tissu épithélial est un tissu composé de cellules serrées les unes contre les autres. Ces cellules reposent sur une lame basale qui est une fine lame de matrice extra-cellulaire, cette dernière permettant l'adhésion à un autre type de tissu. On peut distinguer les tissus épithéliaux en fonction de leur rôle (voir figure 1.17) :

- Tissus de revêtement : ils recouvrent la surface du corps en formant l'épiderme. On les trouve aussi sur les parois de cavités telles que le tube digestif et les voies respiratoires. Ces tissus permettent de séparer l'organisme du milieu extérieur. Ils peuvent être distingués en fonction du nombre de couches de cellules. En effet, il y a les tissus formés d'une seule couche de cellules (épithéliums simples) et ceux formés d'une superposition d'au moins deux couches de cellules (épithéliums stratifiés). Ces tissus assurent un rôle de protection et régulent les échanges avec l'extérieur.
- Tissus glandulaires : Comme les tissus de revêtement, les tissus glandulaires sont faits de cellules épithéliales étroitement juxtaposées et jointives. Ces cellules ont la particularité de sécréter et libérer des produits spécifiques (tels que les hormones, facteurs de croissance, peptides régulateurs..., regroupés sous le terme général de facteurs de signalisation) dans l'organisme. Ces tissus existent sous forme de couche simple ou stratifiée.

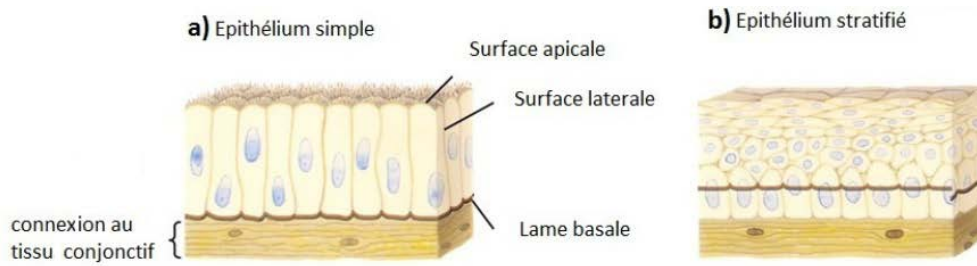


FIGURE 1.17 – Exemple de tissus épithéliaux

1.2.2 Jonctions cellulaires

Dans un tissu épithélial, les cellules sont maintenues jointives à l'aide d'un ensemble de systèmes de jonctions qui s'établissent entre les cellules épithéliales ainsi qu'entre ces cellules et la lame basale. Comprendre les processus qui sont à l'origine de la formation de ces jonctions est essentiel dans le cadre de cette thèse : cela permettra de mieux appréhender le passage d'une cellule isolée à un tissu solide. Par la suite, on essaiera de reproduire ces même processus pour la formation d'agrégats de cellules in vitro. La figure 1.18 résume les différentes jonctions présentes dans un tissu épithélial.

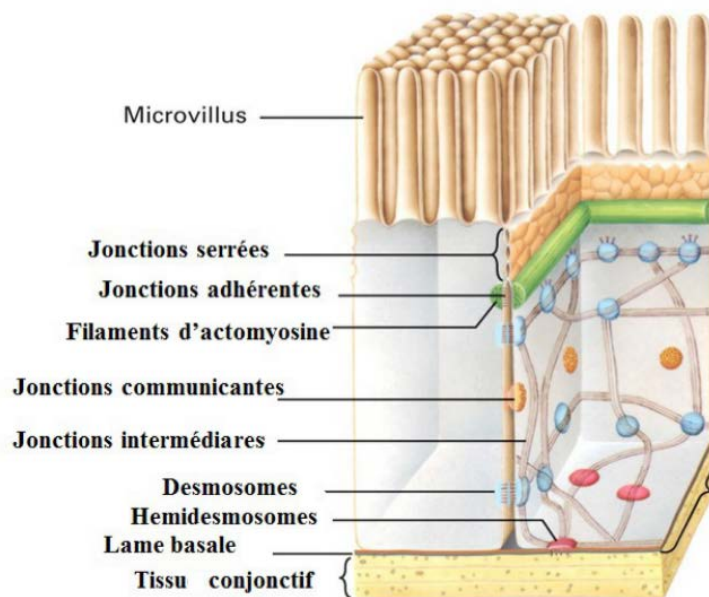


FIGURE 1.18 – Les différentes jonctions dans un tissu épithélial [59]

Les différents types de jonction permettent la cohésion et la communication à l'intérieur du tissu. D'un côté, il y a les jonctions intercellulaires et d'un autre les

jonctions entre cellules et lame basale. Dans le cadre de ce travail, on ne s'intéressera qu'aux jonctions intercellulaires qui sont celles qui permettront de créer un agrégat de cellules à partir des cellules isolées. On distingue trois types de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées, communicantes et d'ancrage.

Jonctions serrées Ces jonctions assurent la soudure des cellules au niveau de la membrane et empêchent le transport moléculaire entre les cellules. Elles forment ainsi une ceinture autour de la cellule à l'aide de protéines (occludine et claudine) qui rattachent les cellules les unes aux autres de manière à empêcher le passage du liquide extra-cellulaire entre les cellules (Figure 1.19).

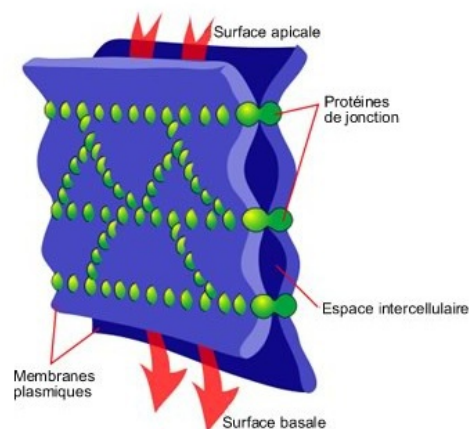


FIGURE 1.19 – Structure de la Jonction serrée [60]

Jonction communicante Cette jonction se présente sous forme d'une juxtaposition de petits canaux de communication cellulaire qui permettent le passage des molécules entre cellules. Chaque connexion est formée de six connexions tournant les unes sur les autres afin de provoquer l'ouverture ou la fermeture du canal (Figure 1.20).

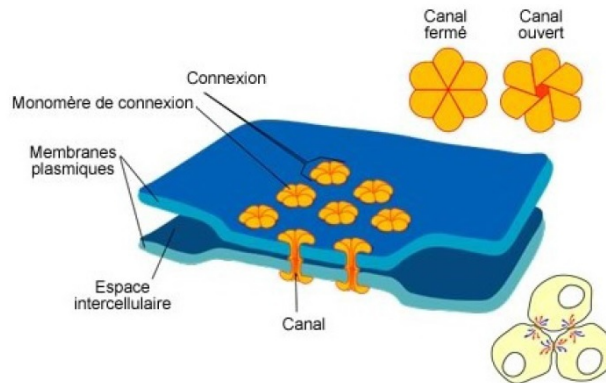


FIGURE 1.20 – Structure de la jonction communicante [60]

Jonctions d’ancrage : jonctions adhérentes et desmosomes Elles ont la même structure que celle des jonctions serrées mais elles permettent l’échange de molécules à travers la membrane. Ces jonctions permettent d’établir une liaison entre les cytosquelettes (actine ou filaments intermédiaires) de cellules voisines ainsi qu’entre les éléments de cytosquelette d’une cellule et la matrice extra-cellulaire. Ainsi elles assurent l’attachement mécanique des cellules entre elles.

1. Les jonctions adhérentes représentent les jonctions d’ancrage reliées aux filaments d’actine. Elles forment une ceinture autour de chaque cellule afin de garder la forme du tissu. Les molécules d’adhésion sont les cadhérines (E-cadhérine) [61]. Ce sont des protéines transmembranaires dont la forme dépend du calcium ; elles sont d’abord liées à la β -caténine, protéine d’association au cytosquelette, elle-même reliée aux micro-filaments d’actine (Figure 1.21).

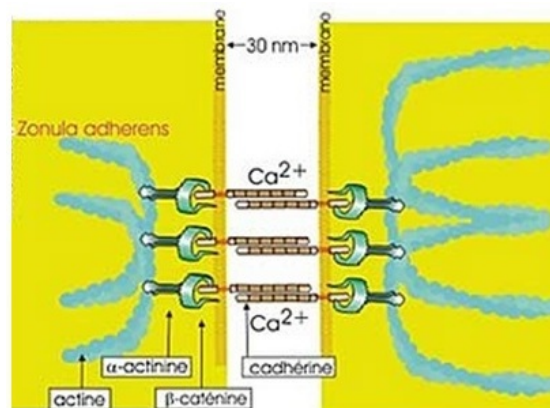


FIGURE 1.21 – Structure des jonctions adhérentes [62]

2. Les jonctions desmosomes contiennent aussi de la cadhérine sous forme de desmoglérine et de desmocolline, liée cette fois à la plakoglobine, qui est une

protéine qui ressemble à la β -caténine, elle-même liée à la desmoplakine qui fixe les filaments intermédiaires. Les filaments intermédiaires forment un cadre structural pour le cytoplasme et assurent sa résistance aux forces latérales (Figure 1.22).

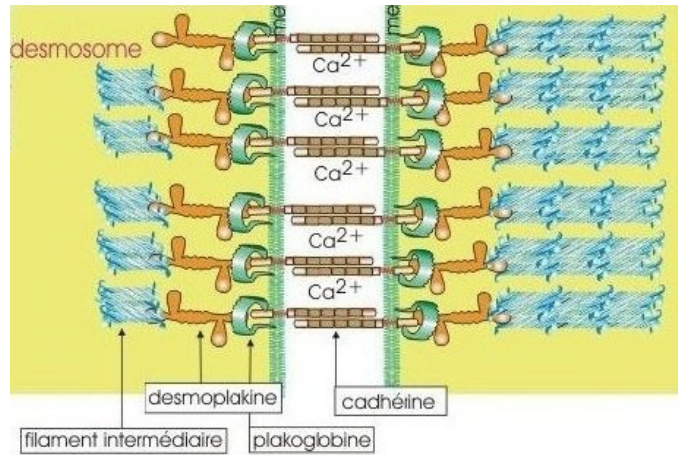


FIGURE 1.22 – Structure des jonctions desmosomes [62]

Lors de la synthèse des agrégats de cellules, on essaiera de reproduire la jonction adhérente qui est la jonction essentielle pour la tenue mécanique du tissu. Ce choix se justifie également par le fait que c'est la seule jonction que l'on peut contrôler, en jouant sur la concentration du calcium dans le milieu [63].

1.2.3 Comportement électrique des tissus biologiques

Le corps humain est un milieu hétérogène composé d'un ensemble d'entités biologiques ayant des propriétés différentes. Les tissus biologiques peuvent avoir un comportement diélectrique comme ils peuvent avoir un comportement conducteur. En général, plus un tissu est constitué d'eau, plus il est conducteur ; plus il est sec, plus il est résistant. Gabriel et al. ont montré que les propriétés électriques des tissus biologiques dépendent de la fréquence du champ électromagnétique appliqué (Figure 1.23) ainsi que de la structure des tissus.

Les tissus biologiques ont des caractéristiques électriques spécifiques et présentent des valeurs qui peuvent paraître surprenantes. Cela est dû à leur composition hétérogène. Sur la figure 1.23, on constate que la conductivité des tissus est faible mais non nulle. Les tissus ne peuvent donc pas être décrits par un comportement uniquement diélectrique. Cependant, la caractérisation électrique des tissus biologiques est difficile. Pour la plupart des tissus, il n'est pas possible de réaliser les mesures permettant la caractérisation électrique in vivo. Les mesures sont souvent effectuées in vitro, sachant que les propriétés électriques peuvent être influencées par de nombreux facteurs (état de conservation, température...), ce qui rend la comparaison

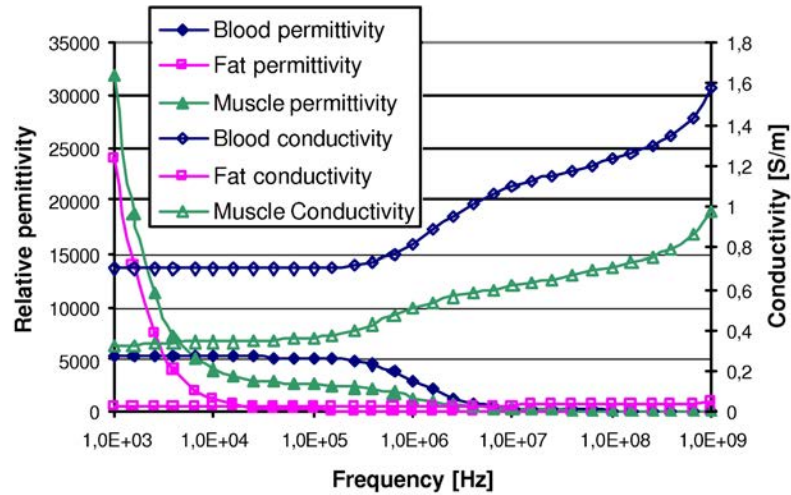


FIGURE 1.23 – Caractéristiques électriques du sang, de la graisse et du muscle en fonction de la fréquence [64]

entre études difficile. C'est pour cette raison que les valeurs annoncées varient d'un article à autre. Toutefois, les spectres diélectriques des tissus biologiques rapportés dans tous les articles présentent la même allure (Figure 1.24).

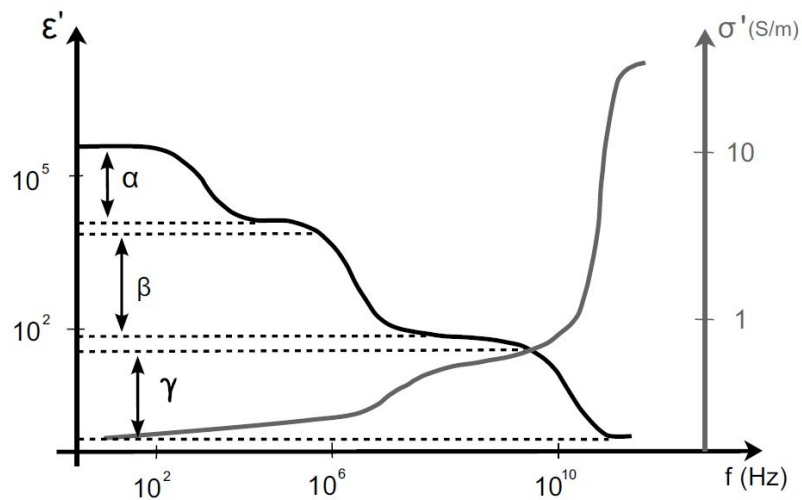


FIGURE 1.24 – Spectre diélectrique caractéristique des tissus biologiques

On constate généralement que la conductivité augmente modérément lorsque la fréquence augmente, jusqu'à atteindre un palier entre 10 et 100 MHz. En basse fréquence, les tissus peuvent donc être considérés comme isolants. Au-delà de 100 MHz, la conductivité augmente fortement. Au contraire, la permittivité relative est souvent élevée à basse fréquence et diminue quand la fréquence augmente. Selon Schwan [9], cette chute de permittivité correspond aux trois régions de dispersions

notées α , β et γ . La dispersion α qui intervient à basse fréquence, peut être due à plusieurs phénomènes, parmi lesquels on évoque en général la diffusion des ions à proximité des surfaces de cellules [65] ainsi que la polarisation de la double couche autour de la cellule ; la dispersion β est reliée à la nature de la membrane cellulaire qui filtre les courants en basse fréquence et les laisse passer en haute fréquence. En effet cette dispersion est liée aux polarisations de Maxwell Wagner qui apparaissent à l'interface de deux milieux diélectriques (paragraphe 1.1.4). La dispersion γ traduit la relaxation dipolaire des molécules d'eau.

1.2.4 Techniques de caractérisation des tissus

Il existe différentes techniques qui permettent la caractérisation des tissus biologiques. Parmi ces techniques, on trouve les examens histologiques permettant d'évaluer les propriétés mécaniques des tissus, grâce à l'étude de leurs architectures à l'échelle microscopique. Le principal inconvénient de cette technique est qu'elle nécessite beaucoup de temps [66]. Les techniques ultrasonores microscopiques sont aussi considérées comme outils de caractérisation des tissus biologiques. Elles sont basées sur l'analyse des signaux ultrasonores rétrodiffusés par le tissu. Ces signaux donnent une information sur l'organisation, la taille et les propriétés mécaniques du tissu. Cependant, cette technique est difficilement applicable *in vivo* à cause de l'atténuation des tissus intermédiaires, situés entre la sonde et la région d'intérêt. La microscopie électronique est aussi utilisée pour examiner la structure du tissu [67]. La spectroscopie d'impédance est une technique de caractérisation électrique qui permet de déterminer l'impédance électrique du tissu biologique. Par rapport aux techniques citées précédemment elle est non invasive et simple à utiliser. Cependant, lors des mesures, il est important de prendre en considération les perturbations produites par les changements de température, la variation de la conductivité du milieu extracellulaire ainsi que la position des électrodes. En effet, des études ont montré la sensibilité du spectre d'impédance vis-à-vis de ces trois facteurs [48] [68]. Dans la littérature, on trouve des exemples d'application de la spectroscopie d'impédance, tels que la caractérisation de l'ischémie¹⁰ d'un tissu cardiaque [4]. Au cours de l'ischémie, l'apport sanguin au cœur diminue, ce qui entraîne une baisse d'oxygénation du tissu. Ainsi, le tissu subit des changements progressifs conduisant à une perte irréversible de sa viabilité, tels que l'accumulation de produits métaboliques et le gonflement des cellules provoqué par la fermeture des jonctions. La spectroscopie d'impédance s'est avérée être une technique séduisante permettant d'observer ces changements sur le muscle cardiaque, le foie de porc, le tissu musculaire squelettique de lapin [66] et le foie ischémique canin (Figure 1.25).

10. L'ischémie est une insuffisance de la circulation du sang dans un organe. Cette diminution conduit à une baisse d'oxygénation des tissus de l'organe, ce qui peut entraîner la perturbation, voire l'arrêt de sa fonction.

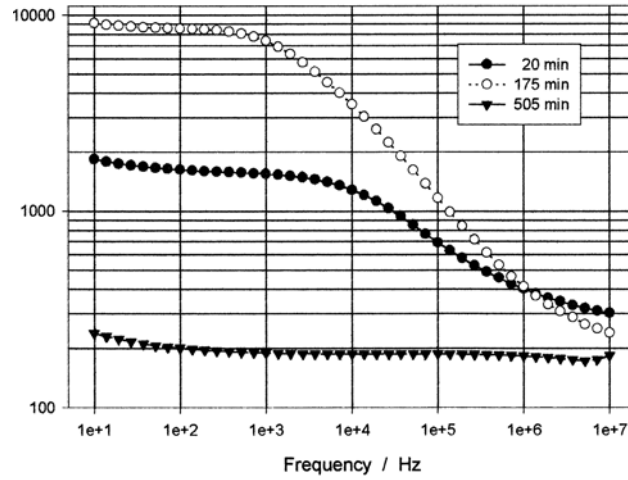


FIGURE 1.25 – Impédance d’un foie ischémiq e canin en fonction de la fréquence et de la durée de l’ischémie [48].

Dans le cas des tissus biologiques, la mesure d’impédance s’effectue en mettant le tissu biologique en contact avec les électrodes de mesure (Figure 1.26). En présence du champ électrique, les ions contenus dans le tissu interagissent avec les charges au niveau des électrodes. Cette interaction provoque la formation d’une double couche ainsi qu’un transfert d’électrons entre les molécules du tissu et les électrodes (voir paragraphe 1.1.4). Cependant, pour des fréquences supérieures à quelques kHz, l’impédance résultant du transfert d’électrons entre le tissu et les électrodes est faible et pourra être négligée.

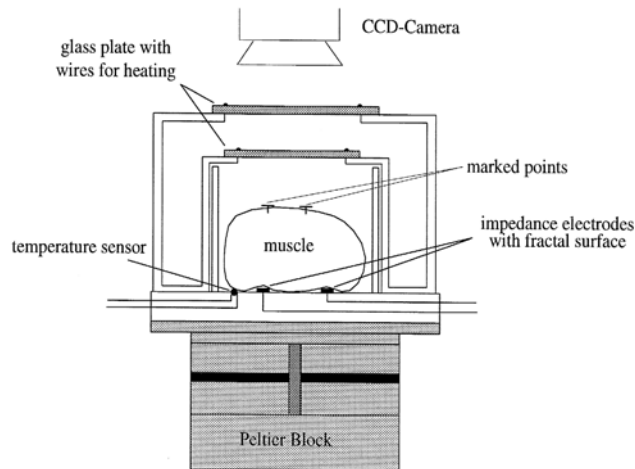


FIGURE 1.26 – Cellule de mesure à température réglable, dédiée à la spectroscopie d’impédance des tissus biologiques (muscle) [66].

Il existe différentes configurations d'électrodes permettant la mesure d'impédance, parmi lesquelles on peut citer la méthode à deux électrodes adaptée aux fréquences inférieures à 100 MHz. Cette méthode consiste à mettre le tissu en contact avec deux électrodes parallèles afin de mesurer l'impédance (voir Figre 1.27).

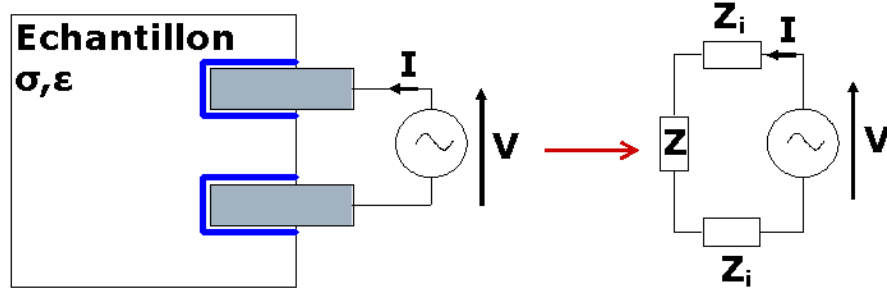


FIGURE 1.27 – Mesure d'impédance d'un tissu en utilisant deux électrodes. Z_i représente l'impédance d'interface électrode/tissu et Z représente l'impédance du tissu [69].

Cette impédance est fonction des caractéristiques électriques du tissu (la conductivité σ et la permittivité ϵ) et s'exprime ainsi [69] :

$$\underline{Z} = \frac{\kappa}{\sigma + j\omega\epsilon} \quad (1.10)$$

κ représente la constante de sonde à deux électrodes qui dépend uniquement de la géométrie de la sonde. Dans le cas de deux électrodes rectangulaires planes, on a :

$$\kappa = \frac{e}{S} \quad (1.11)$$

où e et S représentent respectivement la distance entre les deux électrodes et la surface d'électrode.

L'impédance équivalente du système peut s'écrire sous la forme suivante :

$$\underline{Z}_{tot} = \frac{V}{I} = 2\underline{Z}_i + \underline{Z} = 2\underline{Z}_i + \frac{\kappa}{\sigma + j\omega\epsilon} \quad (1.12)$$

Il existe une grande différence entre les propriétés électriques des tissus biologiques et celles des circuits électroniques. En effet, dans un tissu biologique, le mouvement des ions est le premier responsable du courant tandis que dans les circuits électroniques, c'est le mouvement d'électrons qui induit le courant. C'est pour

cela que les paramètres électriques d'un tissu biologique dépendent de plusieurs paramètres tels que la concentration et le type des ions ainsi que le coefficient de diffusion. Malgré la différence entre la caractérisation des tissus biologiques et celle des circuits électriques, des modèles similaires peuvent être utilisés pour décrire le comportement électrique.

Dans la littérature, on trouve des modèles électriques de tissus simples tels que le foie. Ces modèles s'appuient sur les modèles des cellules isolées. La figure 1.28 représente par exemple le modèle électrique équivalent de trois cellules de foie de porc interconnectées. R_e , R_i , C_m , C'_m et R_g décrivent respectivement la résistance de l'électrolyte extracellulaire, la résistance R_i intracellulaire du cytoplasme, la capacité de la membrane, la capacité de la membrane de la cellule adjacente, la résistance de la jonction communicante qui relie les deux cellules adjacentes. Dans le cas d'une cellule unique le modèle présenté dans la figure 1.28 est équivalent à celui présenté dans la figure 1.3.

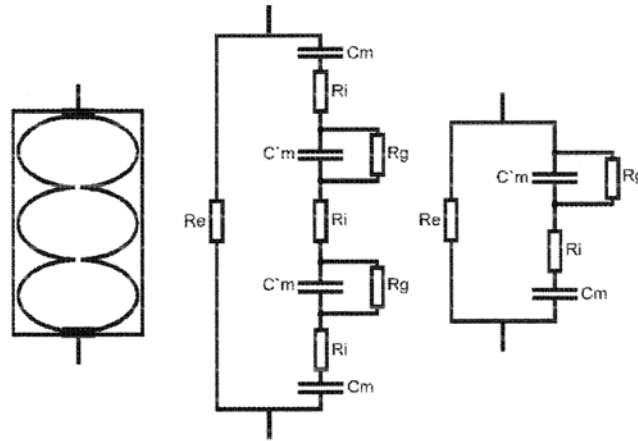


FIGURE 1.28 – Modèle électrique du foie de porc [48].

Un autre modèle est présenté dans [70] pour un échantillon de pomme de terre. L'avantage de la pomme de terre réside dans le fait que c'est un tissu grossièrement homogène, ce qui rend sa modélisation plus simple. Cette modélisation électrique a été effectuée en faisant des mesures d'impédancemétrie sur un échantillon de pomme de terre. Le dispositif de mesure utilisé est présenté sur la figure 1.29. L'échantillon est placé entre deux électrodes planes.

La figure 1.30 présente le spectre d'impédance de l'échantillon de pomme de terre, avec le modèle électrique associé. La courbe traduit le comportement électrique du tissu en fonction de la fréquence. On constate un comportement résistif en basse fréquence dû à la conductivité du milieu extra-cellulaire. Ensuite, en augmentant la fréquence, la conductivité intracellulaire et le comportement diélectrique des membranes interviennent et à partir de quelques centaines de MHz c'est le comportement diélectrique du milieu extracellulaire qui commence à apparaître.

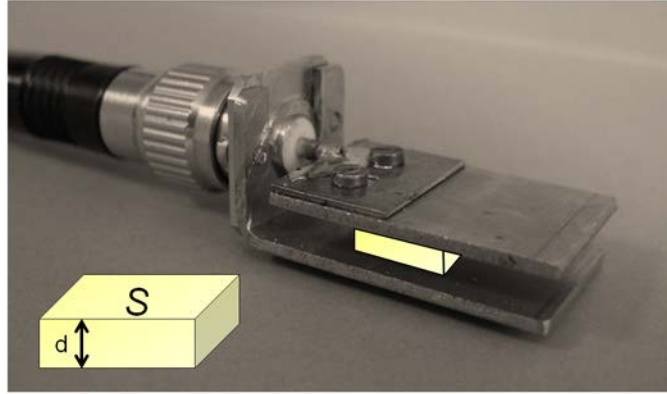


FIGURE 1.29 – Dispositif dédié à la mesure d'impédance ($d=4$ mm ; $S=1.1$ cm^2) [70].

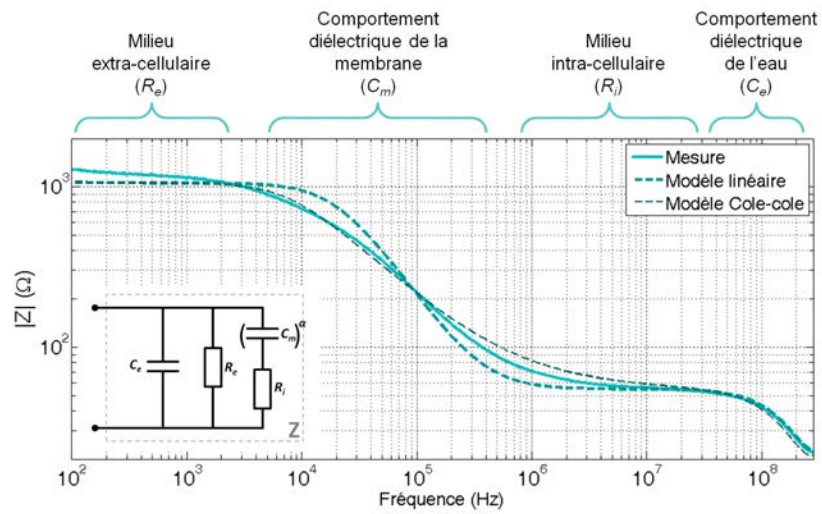


FIGURE 1.30 – Mesure et modèle d'un échantillon de pomme de terre (épaisseur 4 mm, section $1,1$ cm^2 (Figure 1.29)). Le modèle linéaire n'utilise pas le coefficient de Cole-cole α . Dans le modèle de Cole-cole, ce dernier permet d'ajuster la pente associée aux propriétés capacitatives des membranes [70].

Sur cette figure, les mesures ont été exploitées en utilisant deux modèles : le premier est un modèle linéaire tandis que le deuxième est le modèle de Cole-cole. Sur la figure on constate que ce dernier est plus adapté à cette mesure. En effet, entre 10^4 Hz et 10^6 Hz la pente dans le diagramme de Bode est différente de -20 dB/décade, ce que le coefficient de Cole-cole α permet de traduire.

Dans cette thèse, nous cherchons à faire le lien entre les caractéristiques électriques de cellules isolées et celles d'amas cellulaires, dont la structure est amenée à terme à évoluer pour se rapprocher de celle d'un tissu. Aussi, le paragraphe suivant s'intéresse aux différentes approches de construction tissulaire.

1.3 Différentes approches de construction tissulaire

L'ingénierie tissulaire (IT) est un domaine de recherche émergent multidisciplinaire basé sur l'intégration des progrès de la biochimie, de la biophysique, des biomatériaux et des sciences de la vie. L'un des challenges dans ce domaine est d'être en mesure d'imiter l'environnement naturel d'un tissu, dans lequel les cellules sont organisées de façon particulière. Dans ce qui suit, nous présentons deux approches de fabrication de tissus. La première est une approche "top-down", elle consiste à faire croître les cellules sur une structure d'échafaudage (ou scaffold) qui fournit un support pour guider la division et l'assemblage tridimensionnel des cellules. La deuxième technique est une approche "bottom-up", basée sur l'assemblage de cellules isolées en agrégats de cellules, qui peuvent être fusionnés par la suite pour aboutir à des structures plus complexes.

1.3.1 L'emploi de "structures d'échafaudage" (ou scaffolds)

Les cellules n'étant pas capables de s'auto-organiser en tissu en absence de guides ou de signaux, une approche traditionnellement utilisée en ingénierie tissulaire consiste à les faire croître in vitro sur des structures d'échafaudage naturelles ou synthétiques (Figure 1.31). Ces structures offrent ainsi un support facilitant l'adhésion et la migration cellulaires. Elles sont généralement poreuses et interconnectées, et obtenues à partir de polymères biodégradables ou de céramiques biocompatibles. La fabrication d'une structure 3D de géométrie adéquate peut être réalisée à l'aide de techniques de prototypage rapide.

L'un des inconvénients de cette approche "top-down" est la difficulté à exercer un contrôle précis sur l'organisation cellulaire dans une même matrice. Toutefois, compte-tenu des avancées récentes dans la structuration des biomatériaux, elle reste prometteuse. Des chercheurs ont ainsi réussi à réaliser des structures 3D arbitraires avec une résolution inférieure au micromètre grâce à la technique de polymérisation à deux photons [71].

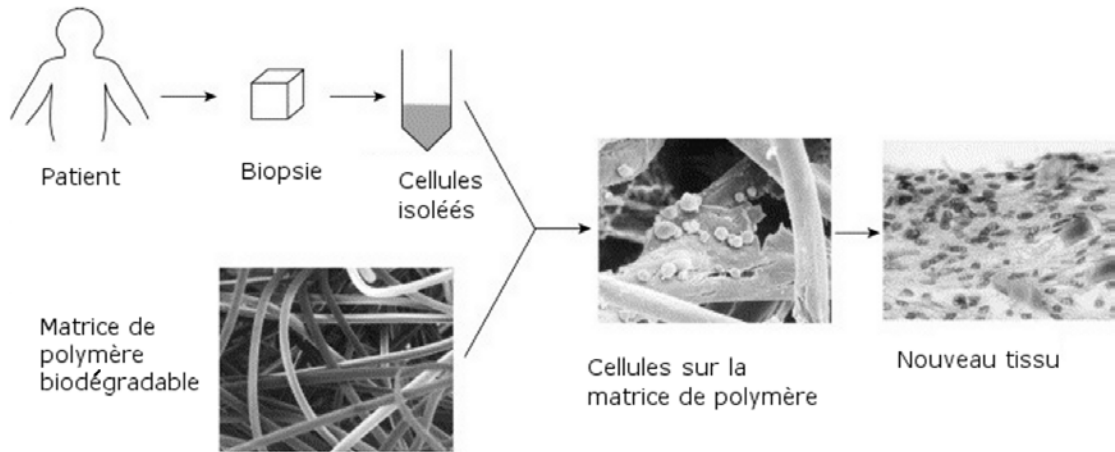


FIGURE 1.31 – Régénération d'un tissu à partir de cellules isolées [72]

1.3.2 Techniques basées sur une approche "bottom-up"

L'approche "bottom-up" présente une très bonne alternative à l'assemblage de cellules basé sur les "structures d'échaffaudage" (approche top-down). En effet, l'assemblage "bottom-up" permet un meilleur contrôle de l'organisation cellulaire, comme il permet l'intervention au niveau des assemblages (telle que le remplacement de cellules spécifiques dans un tissu) [73]. De plus, cette approche est idéale pour l'étude des interactions entre cellules.

Parmi les techniques basées sur l'approche "bottom-up", on peut citer l'assemblage de cellules par reconnaissance moléculaire. Cette approche consiste à greffer des agents de couplage complémentaires à la surface des cellules afin de permettre leur assemblage en agrégats (Figure 1.32).

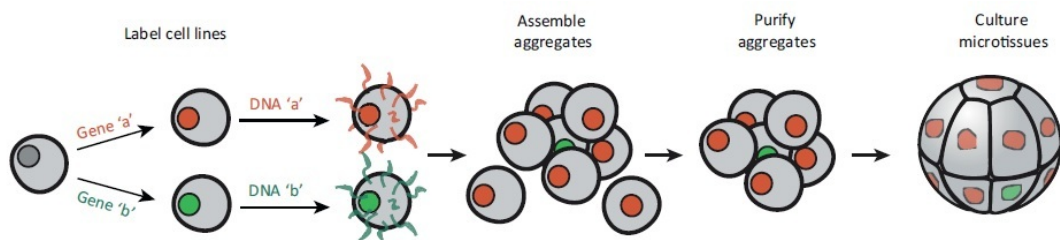


FIGURE 1.32 – Assemblage de cellules épithéliales par reconnaissance moléculaire, suivie d'une purification par cytofluorométrie (FACS). L'agrégat est ensuite cultivé dans une matrice extracellulaire afin de former un microtissu [73]

D'autres procédés de biofabrication automatisables connaissent également un essor très important, parmi lesquelles on trouve les techniques d'impression jet

d'encre [74] ou reposant sur l'emploi de micro-seringues. Elles permettent d'envisager la réalisation d'assemblages cellulaires complexes, mais reposent généralement sur l'emploi d'équipements sophistiqués.

Dans le cadre de cette thèse nous nous intéressons aux techniques basées sur l'emploi de forces permettant d'amener les cellules en contact, favorisant un établissement plus rapide des interactions entre cellules. Ces forces peuvent être d'origine optique, magnétique ou diélectrophorétique [75]. Souza et al. ont proposé une technique de création d'agrégats en trois dimensions basée sur la lévitation magnétique [76]. L'inconvénient majeur de cette technique réside dans la nécessité de marquer les cellules magnétiquement pour les attirer vers l'aimant (Figure 1.33).

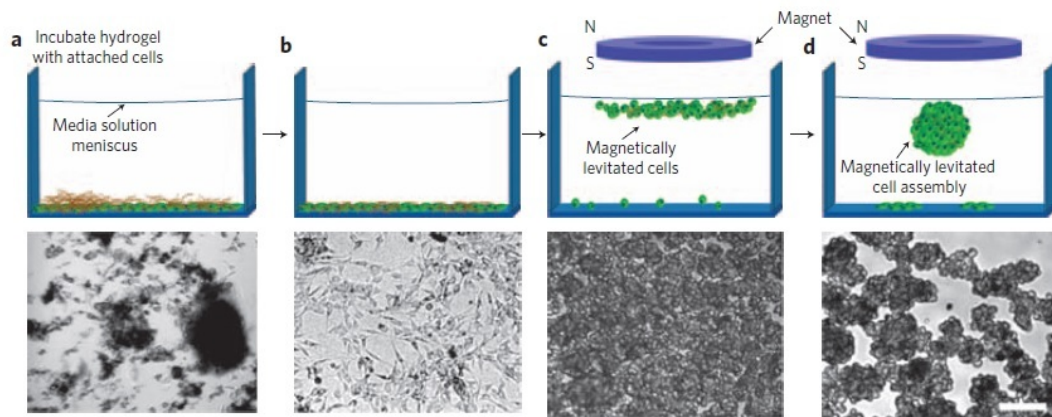


FIGURE 1.33 – Assemblage de cellules souches neurales avec lévitation magnétique. a) Marquage magnétique des cellules. b) Etape de lavage pour enlever les marqueurs qui n'ont pas interagi avec les cellules. c) La présence d'un aimant au-dessus de la boîte de Pétri permet d'attirer les cellules à l'interface air-milieu de suspension. L'image montre la culture 15 minutes après la lévitation. d) Après 12 h de lévitation, une structure multicellulaire se forme (barre d'échelle = $30\ \mu\text{m}$) [76]

Contrairement aux autres forces, la diélectrophorèse permet d'assembler un grand nombre de cellules à la fois, sans nécessiter de marquage préalable des cellules. Sebastian et al. ont utilisé la diélectrophorèse (DEP) positive pour créer des agrégats de cellules en trois dimensions [77]. Les cellules rassemblées sous l'effet de la DEP positive au niveau du maximum de champ électrique ont pu adhérer les unes aux autres après plusieurs minutes d'application du champ. La figure 1.34b) montre l'agrégat de cellules Jurkat¹¹ 1h après la coupure du champ électrique. Les cellules à la surface se détachent de l'agrégat tandis que celles au milieu restent liées les unes aux autres.

¹¹. Des cellules de lymphocytes humains.

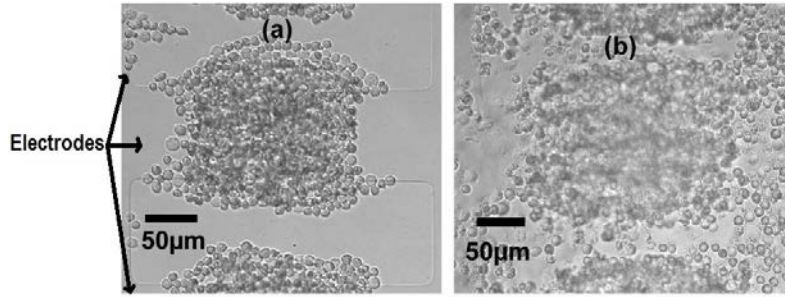


FIGURE 1.34 – Agrégation de cellules Jurkat par DEP positive sous $20V_{cc}/1\text{MHz}$. a) Agrégat obtenu après 15 min d'exposition. Le champ électrique est maintenu 15 min supplémentaires, ensuite le milieu de suspension est remplacé par le milieu de culture. b) Agrégat 1h après la coupure du champ électrique.

Au vu de cet exemple, l'utilisation de la diélectrophorèse pour la formation d'agrégats de cellules permanents semble très prometteuse. La forme de l'agrégat obtenu peut en effet être ajustée en jouant sur la forme des électrodes servant à générer le champ, tandis qu'il est possible de contrôler sa taille en adaptant la concentration des cellules. L'expérience de Sebastian et al. a été effectuée sur des cellules adhérentes (ostéoblastes) et non adhérentes (Jurkat, lymphocytes T). La nature des interactions ayant permis de conserver le caractère permanent des agrégats après coupure du champ reste cependant mal identifiée. Par ailleurs, les agrégats étant formés par DEP positive, les cellules sont soumises à des valeurs d'intensité de champ électrique élevé. Compte-tenu de la durée d'exposition nécessaire à la formation des agrégats, il est probable que cette exposition soit nuisible aux cellules (risque accru d'électroporation, diminution de la viabilité). Dans la suite de cette thèse, nous montrerons que la DEP négative peut également être employée pour obtenir des agrégats permanents de cellules, ce qui permet de limiter les niveaux d'exposition des cellules au champ électrique.

1.4 conclusion

L'objectif de cette thèse visant à établir le lien entre les cellules et les tissus en termes de propriétés électriques, nous nous sommes attachés à couvrir différents aspects dans ce premier chapitre : dans un premier temps, nous avons décrit la cellule d'un point de vue structural, mais également sous l'angle de la modélisation électrique. Nous nous sommes également intéressés aux techniques de caractérisation de cellules individuelles, dont l'électrorotation, qui sera utilisée au chapitre suivant pour étudier les propriétés de cellules épithéliales rénales HEK 293. La deuxième partie visait à décrire les tissus biologiques, plus précisément les tissus épithéliaux, en termes de structure, mais également de comportement électrique. Les méthodes de caractérisation électrique des tissus ont été abordées. La troisième partie visait à présenter différentes techniques d'assemblages de cellules en tissus. Ces deux échelles d'études très différentes des matériaux biologiques peuvent être rapprochées progressivement en recourant aux techniques d'assemblage "bottom-up", permettant de recréer un microenvironnement complexe en partant de l'élément de base : la cellule. Parmi ces techniques, la diélectrophorèse semble une approche intéressante pour la formation d'agrégats de cellules de forme contrôlée, qui constitueront de premiers modèles (très) simplifiés de tissus. La mise en oeuvre de cette technique sera abordée au chapitre 3.

Chapitre 2

Caractérisation électrique des cellules HEK par électrorotation

Ce chapitre est consacré à la caractérisation électrique des cellules isolées de reins d'embryons humains (HEK) 293. L'utilisation de ce type cellulaire se justifie par le fait que ce sont des cellules eucaryotes adhérentes comme c'est le cas de la majorité des cellules constituant les tissus solides. Les HEK sont notamment des cellules d'épithélium, dont la structure a été décrite au chapitre précédent. Dans la première partie, nous présentons le dispositif expérimental qui permet la mise en œuvre de la technique d'électrorotation ainsi que l'acquisition vidéo de la rotation des cellules biologiques. La deuxième partie est consacrée à l'exploitation des spectres d'électrorotation des cellules : c'est à partir de ces données que sont extraites leurs propriétés électriques.

2.1 Banc d'expérimentation

La figure 2.1 représente l'ensemble du matériel nécessaire pour conduire une expérience d'électrorotation. Dans cette chaîne d'instrumentation, chaque élément joue un rôle important :

- un incubateur pour la culture cellulaire. Il s'agit d'une enceinte thermostatée, généralement réglée à 37°C pour la culture des cellules humaines. Elle est équipée d'une arrivée de CO_2 et d'un bac d'eau afin d'obtenir une atmosphère interne à 5 % de CO_2 et environ 98 % d'humidité.
- quatre générateurs de tension branchés aux électrodes du microsystème utilisé. Les générateurs sont également reliés à un oscilloscope afin de visualiser les signaux de sortie. Ces instruments sont connectés à un ordinateur qui les pilote via une interface GPIB (General Purpose Interface Bus).
- un microscope équipé d'une caméra dédiée à l'observation et à l'acquisition de la rotation des particules sous l'effet du champ électrique tournant.

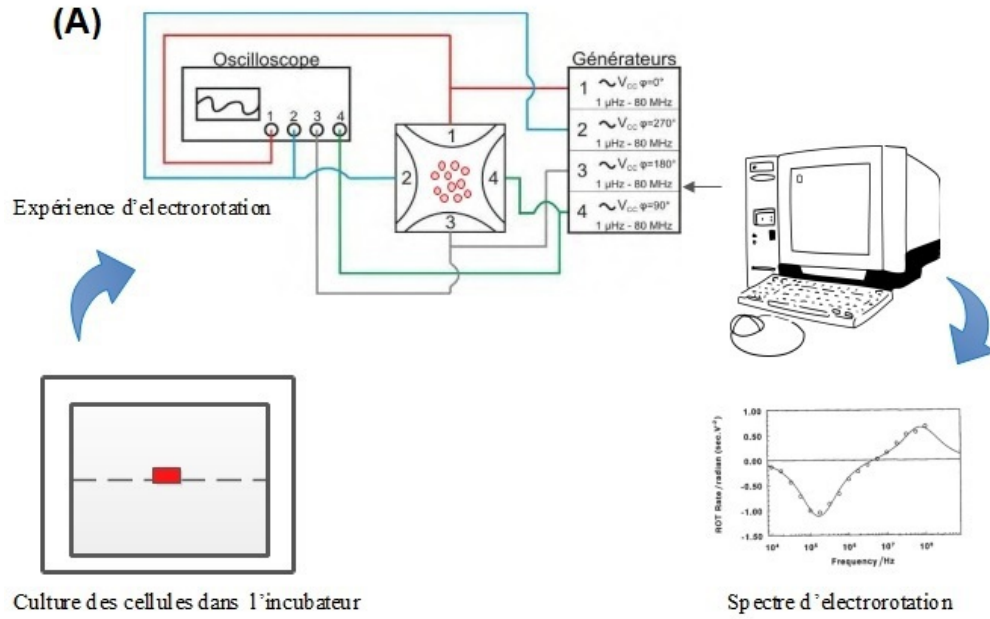


FIGURE 2.1 – (A) Dispositif expérimental employé pour l'électrorotation (les masses des générateurs sont interconnectées). (B) Plateforme servant à l'acquisition des vidéos de rotation des cellules HEK 293.

Ce banc expérimental a été mis en place lors de la thèse de Julie Laforêt [40].

2.1.1 Microsystème et champ électrique tournant

a) Choix du type d'électrodes

Le microsystème se présente sous forme de quatre électrodes polynomiales constituées d'une fine couche d'or de 200 *nm* déposée sur un wafer en pyrex recouvertes d'une couche de 50 *nm* de chrome (couche d'accroche). Deux électrodes opposées sont espacées de 400 μm (Figure 2.2).

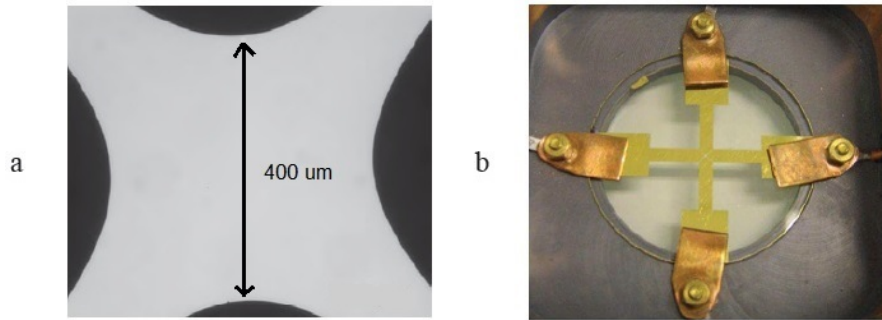


FIGURE 2.2 – Le microsystème utilisé

Cette géométrie d'électrodes hyperboliques a été définie par Huang et al. à partir de polynômes du deuxième ordre [78]. Plus précisément, la procédure de conception de ces électrodes est basée sur le fait que l'on suppose que le potentiel électrique créé par un système d'électrodes est décrit en n'importe quel point de l'espace (x, y, z) par un polynôme qui obéit à l'équation de Laplace. La forme des électrodes est obtenue en traçant les équipotentielles :

$$x^2 - y^2 = \pm a^2 \quad (2.1)$$

avec $2a$ la distance qui sépare deux électrodes en face à face (soit 400 μm dans notre cas).

Les électrodes hyperboliques polynomiales permettent de générer un champ électrique relativement uniforme dans l'espace inter-électrodes. Cette uniformité nous permet notamment d'obtenir un couple quasi-constant, c'est-à-dire une vitesse de rotation constante des cellules [79](Figure 2.3).

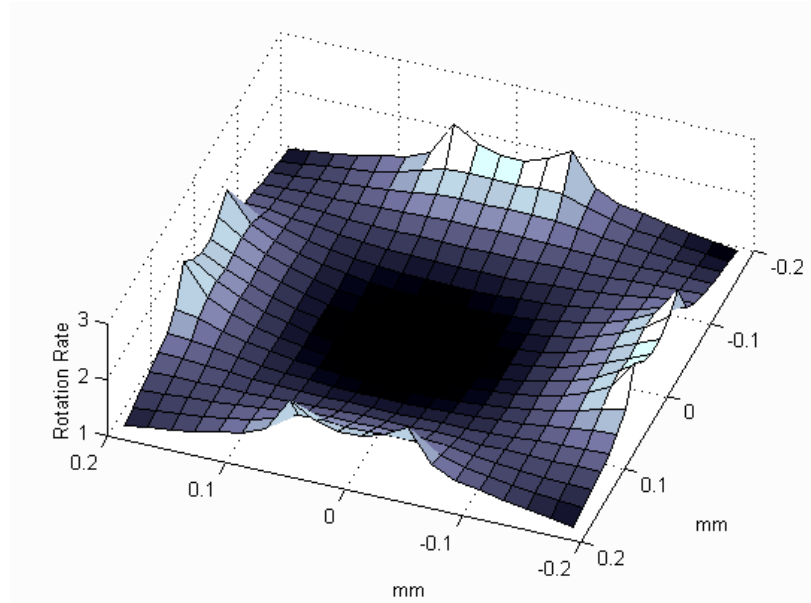


FIGURE 2.3 – Variation spatiale du champ E_{eff}^2 dans le microsystème avec des électrodes polynomiales [79].

b) Procédé de microfabrication

Ces électrodes sont réalisées en salle blanche en employant la technique de Lift-off. Cette technique permet de créer des motifs dans un matériau (ici de l'or), sur un substrat, en employant une couche sacrificielle de résine photosensible. La figure 2.4 explique les étapes de fabrication des électrodes en or. La résine utilisée est la AZ5214 de chez Clariant. Cette résine photosensible positive contient dans sa formulation un agent réticulant qui devient actif à des températures supérieures à 110°C. Cette caractéristique lui permet de changer de polarité suite à une étape de recuit dit d'inversion, ce qui fait d'elle une résine réversible. Toutefois, cette résine est plus utilisée en mode négatif. En effet, une résine positive donne un profil avec une pente de 75° à 80° au niveau des bords (en fonction du protocole et du matériel utilisés). Ceci est principalement dû à l'absorption des composés photoactifs qui atténuent les radiations traversant la couche de résine lors de l'étape d'insolation. En conséquence, lors du développement, la vitesse de dissolution est plus rapide dans la partie supérieure que dans la partie inférieure de la couche de résine. Cependant, en effectuant un recuit, la partie supérieure de la couche de résine est plus réticulée que la partie inférieure, donc lors du développement, la partie inférieure va se dissoudre plus rapidement que la partie supérieure, ce qui donne un profil inversé favorisant le décollement de la résine [80] (Figure 2.5). D'où l'intérêt d'utiliser cette résine en mode négatif pour le lift-off.

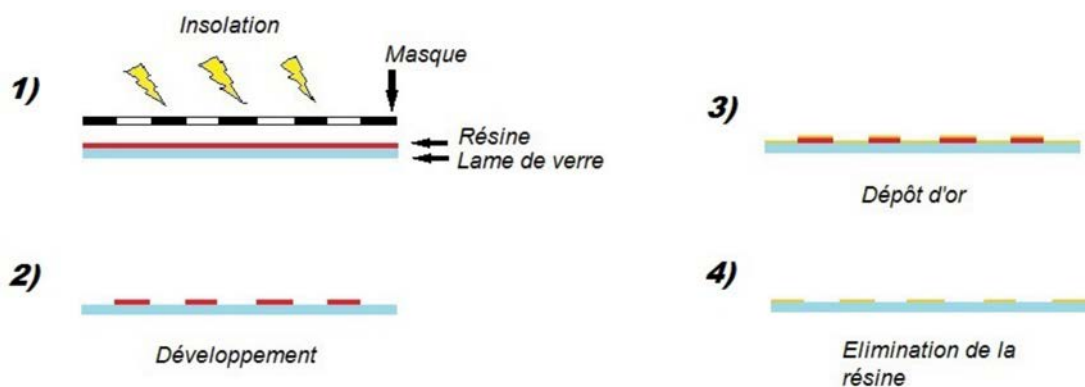


FIGURE 2.4 – Etapes de fabrication des électrodes en or.

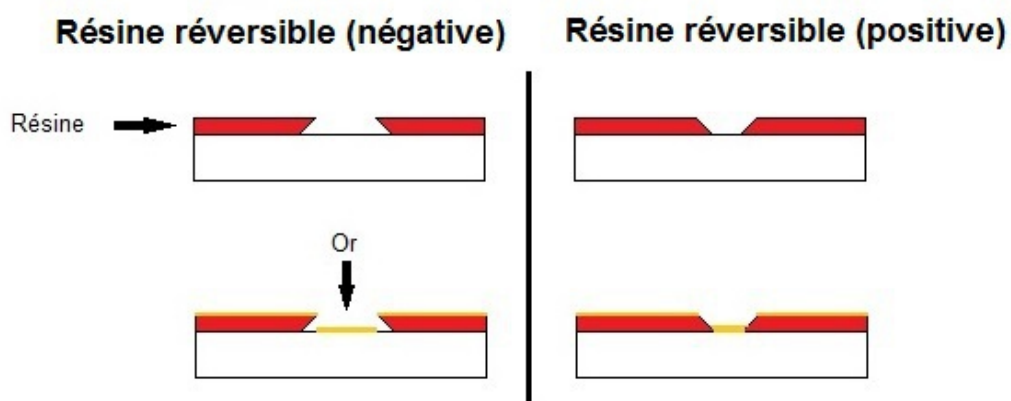


FIGURE 2.5 – Comparaison entre les profils obtenus en utilisant la résine réversible AZ5214 en mode positif et en mode négatif.

Pour la fabrication de ces électrodes, la résine AZ5214 a été utilisée en mode négatif sur une lame de verre en employant le protocole suivant :

1. Nettoyage des lames à l'acétone puis à l'éthanol.
2. Chauffage des lames sur plaque à 110°C pendant 1 min.
3. Dépôt de la résine sur ces lames à une vitesse de spin coating¹ de 4500 tr/min durant 30 s à l'aide de l'appareil 3LE.
4. Recuit des lames enduites de résine à 110°C durant 1 min.
5. Insolation des lames à travers les masques adéquats pour n'exposer que certaines parties aux UV à 30 mW/cm^2 durant 1.7 s. Ces lames sont remises sur la plaque à 110°C pendant 1 min avant de subir une deuxième insolation (sans le masque), de durée 11.7 s.
6. Développement de la résine en employant le développeur AZ 726 MIF durant 20 s. Cette étape permet d'éliminer la partie non exposée aux UV (résine négative).
7. Dépôt par évaporation d'une couche de chrome de 50 nm, puis d'une couche d'or de 200 nm.
8. Elimination de la résine avec de l'acétone pour ne garder que les motifs en or sur la lame de verre.
9. Nettoyage à l'éthanol avant rinçage et séchage.

c) Génération du champ électrique tournant

Les quatre électrodes du microsystème ainsi réalisées sont chacune branchées à une source de tension. Pour générer un champ électrique tournant dans l'espace inter-électrodes (Chapitre I, figure 1.7), les électrodes adjacentes sont alimentées par des tensions en quadrature.

On utilise pour cela quatre générateurs de signaux arbitraires (Agilent 33250A) synchronisés entre eux. Ce type de générateurs délivre des tensions sinusoïdales allant du continu à 80 MHz. Les cellules sont placées au milieu de la zone inter-électrodes afin de bénéficier de l'uniformité du champ. Il est possible pour cela de les soumettre à la diélectrophorèse négative dans un premier temps, en appliquant des tensions déphasées de 180° entre électrodes adjacentes, de fréquence 10 kHz. Ceci a pour effet de ramener les cellules vers le minimum de champ, situé au centre. Pour la manipulation des cellules par électrorotation, on travaille dans une gamme de fréquences allant de 10 kHz à 80 MHz. En dessous de 10 kHz, il y a apparition du phénomène perturbateur d'électro-osmose. Ce phénomène se traduit par un mouvement de liquide près des interfaces chargées (électrodes). Ce mouvement est dû à la composante tangentielle du champ électrique généré par les électrodes. En effet,

1. Un procédé d'enduction centrifuge qui consiste à étaler à l'aide de forces centrifuges une petite quantité de résine sur un substrat.

en présence des charges accumulées sur les électrodes, la composante tangentielle du champ électrique engendre une force de Coulomb qui met en mouvement les charges accumulées, entraînant à leur tour le mouvement du fluide. La figure (2.6) met en évidence la composante du champ électrique responsable du mouvement du liquide ainsi que la trajectoire suivie par les charges de la double couche.

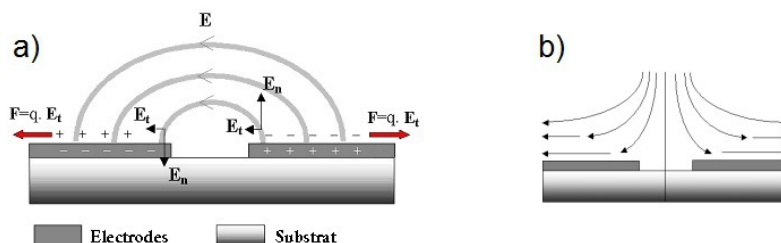


FIGURE 2.6 – a) Le mouvement des charges de la double couche sous l'effet de la force de Coulomb. b) Le sens du déplacement du fluide à l'interface chargée. [81] [82]

Afin de visualiser les signaux en sortie des quatre générateurs, ces derniers sont reliés à un oscilloscope Agilent DSO6034A de bande passante 300 MHz. Les quatre générateurs et l'oscilloscope sont reliés à l'ordinateur via une carte GPIB. Une interface utilisateur graphique a été développée sous Labview afin de commander l'ensemble de ces appareils.

2.1.2 Acquisition et traitement des données

L'observation des cellules dans le microsystème s'effectue à l'aide d'un microscope droit Nikon LV 150. L'objectif utilisé est le Nikon LU PLAN X20. Pour l'acquisition des vidéos, le microscope est relié à une caméra AxioCam HSM. C'est une caméra dont la vitesse peut varier de 60 à 198 images par seconde avec des résolutions de 660 x 494 à 124 x 98 pixels. Elle est pilotée par le logiciel Axiovision, permettant notamment de filmer la rotation des cellules : pour chaque point de fréquence, on enregistre un film de quatre secondes. Les différents films obtenus seront exploités par la suite afin d'extraire la vitesse de rotation des cellules.

L'exploitation des films enregistrés commence par un traitement des images avec Matlab. L'objectif de ce traitement est d'éliminer toutes les cellules non représentatives en se basant sur deux critères : la taille et le positionnement dans l'espace interélectrodes. Pour l'ensemble des images de chaque vidéo, le premier traitement consiste à égaliser l'histogramme, ce qui permet d'améliorer le contraste (Figure 2.7 b)). Ensuite, une détection de contours est effectuée sur les images à l'aide de l'algorithme de Canny (Figure 2.7 c)) [83].

Les contours complets sont remplis (Figure 2.7 d)) et les petits objets (bruit de l'image) sont supprimés de l'image à l'aide d'un filtre morphologique (ouverture morphologique²).

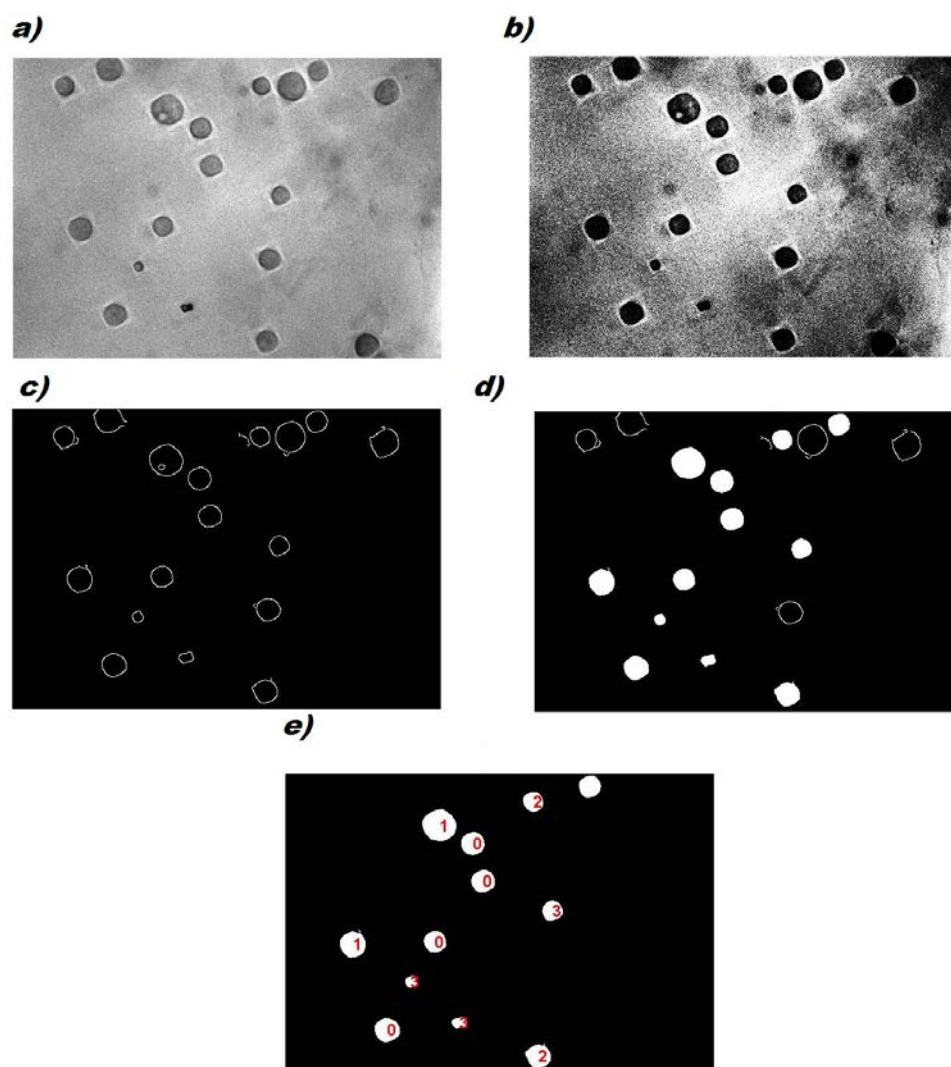


FIGURE 2.7 – Traitement d'image. a) Image d'origine. b) Egalisation d'histogramme. c) Détection de contours. d) Remplissage des contours. e) Suppression des petits objets et étiquetage.

L'étape suivante du programme consiste à étiqueter les contours remplis (représentant les cellules) en fonction de leur taille et de leur positionnement :

2. L'ouverture élimine dans une figure toutes les parties plus étroites que l'élément structurant, et en déforme les coins convexes.

- Les objets du type 0 représentent les cellules isolées que l'on garde pour la mesure de la vitesse de rotation. Ce sont des cellules représentatives du type cellulaire étudié par rapport à leur diamètre et correctement positionnées dans l'espace inter-électrodes.
- Si l'aire du contour rempli est supérieure à 1,15 fois l'aire moyenne d'une cellule, cet objet est du type 1 : il est considéré comme un agrégat de cellules et sera lui aussi éliminé.
- Si le barycentre du contour rempli est à une distance du bord de l'image inférieure à 1,5 fois le diamètre de la cellule, cette cellule est du type 2 : elle est jugée proche du bord et sera donc éliminée.
- Si l'aire du contour rempli est inférieure à 0,8 fois l'aire moyenne d'une cellule, cet objet est du type 3 : il est considéré comme trop petit et sera éliminé.

Pour mesurer la vitesse de rotation des cellules, la technique utilisée est celle développée par Budde et al. [84] (également utilisée par Zhou et al. [85]) dont le principe est le suivant : après segmentation des images, on détermine l'axe principal de chaque objet et on mesure l'angle formé entre cet axe et l'axe horizontal. En suivant un objet sur une séquence d'images, on peut mesurer la variation de l'angle sur un intervalle de temps donné, ce qui donne la vitesse de rotation. Cette technique fonctionne bien lorsque les cellules ne sont pas parfaitement sphériques (comme c'est généralement le cas). De Gasperis et al., quant à eux, estiment la rotation des cellules en utilisant un algorithme basé sur un calcul d'auto-corrélation d'une image à l'autre, en supposant que le centre de gravité de la cellule correspond au centre de sa rotation [86].

2.1.3 Déroulement d'une expérience d'électrorotation

La première étape de l'expérience consiste à préparer les échantillons. Nous commençons par la mise en culture des cellules³ HEK 293 pendant 72 heures dans l'incubateur réglé à 37°C et 5% de CO_2 . Le milieu de culture utilisé est le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose, 4500 mg/L glucose) complété avec 10% du sérum de veau foetal, 100 mg/mL de streptomycine et 0.1 mg/mL de pénicilline. Ce milieu est fortement conducteur (la valeur mesurée à l'aide du conductimètre est de l'ordre de 1 S/m) et ne peut donc pas être utilisé pour l'expérience d'électrorotation. Le milieu de suspension doit en effet être faiblement conducteur afin de pouvoir observer les deux pics du spectre d'électrorotation ainsi que pour éviter l'élévation de la température par effet Joule (pour ne pas endommager les électrodes et ne pas détériorer les cellules).

3. Toutes les manipulations ont été effectuées sous une hotte stérile à flux laminaire vertical.

Une autre contrainte à respecter concerne l'osmolarité⁴, qui doit être de l'ordre de 300 mOsm/L afin d'assurer le maintien physiologique des cellules. Cette valeur d'osmolarité permet en effet d'équilibrer les pressions osmotiques de part et d'autre de la membrane cellulaire.

Avant de réaliser l'expérience d'électrorotation, les cellules sont extraites de leur milieu de culture puis transférées vers le milieu d'électrorotation. Concrètement, on procède à deux lavages qui consistent à centrifuger (avec une vitesse de 233 g pendant 5 min), éliminer le surnageant du milieu de culture et resuspendre les cellules dans le milieu d'électrorotation (avec une concentration de 3.10^5 cellule/mL). Ce milieu est préparé à base de dextrose⁵ (5% dans de l'eau DI) de manière à avoir les caractéristiques suivantes :

- Une conductivité électrique de 50 mS/m, ajustée par ajout de PBS.
- Une osmolarité de 298 mOsm/L (mesurée avec un osmomètre (Löser)).
- Un pH de 7,4.

La conductivité a été fixée à 50 mS/m car à cette valeur, la sensibilité du spectre d'électrorotation à la conductance de la membrane G_m (décrite dans le chapitre précédent) diminue, ce qui permet l'identification des paramètres restant avec une grande précision [46].

La deuxième étape consiste à placer les cellules dans l'espace inter-électrodes. Les cellules en suspension sont déposées dans une chambre réalisée à partir d'un joint en silicone autocollant (S1935, Sigma) collé sur le microsystème. Cette chambre peut contenir un volume de 100 μ L. Elle est fermée sur le dessus à l'aide d'une lamelle de microscope permettant d'éviter les mouvements du fluide pouvant engendrer des phénomènes perturbateurs.

L'expérience d'électrorotation à proprement parler peut alors commencer. Les électrodes sont connectées aux générateurs comme sur la Figure 2.1. L'application des tensions est automatisée : elle s'effectue via l'interface labVIEW permettant de choisir le type d'expérience (électrorotation ou diélectrophorèse). On applique un signal pour différentes fréquences allant de 10 kHz à 80 MHz et on fixe l'amplitude entre 0 et 5V.

La dernière étape de l'expérience est l'acquisition des vidéos en utilisant le logiciel Axiovision. L'ensemble des vidéos est enregistré en séquences d'images sous

4. L'osmolarité désigne la concentration des espèces dites "osmotiquement actives" (capables de provoquer une pression empêchant un solvant de passer au travers d'une membrane semiperméable) (Na^+ , K^+ , glucose...) dans la solution. Elle s'exprime en Osm/L. L'osmolarité extracellulaire doit avoir une valeur comprise entre 280 et 300 mOsm/L (milieu isotonique par rapport au milieu intracellulaire)

5. Forme de glucose, contribuant à augmenter l'osmolarité de la solution et empêcher que les cellules ne gonflent dans le milieu d'électrorotation pauvre en ions et donc hypotonique avant cet ajout.

format jpeg. Ces vidéos seront exploitées sous Matlab pour estimer la vitesse de rotation des cellules pour chaque point de fréquence afin de construire le spectre d'électrorotation (vitesse de rotation en fonction de la fréquence).

Durant les expériences d'électrorotation, différents problèmes ont été identifiés :

- Le premier problème observé est celui de l'adsorption des cellules à la surface du dispositif. Les forces de frottement entre la cellule et la surface peuvent diminuer la vitesse de rotation des cellules voire dans certains cas l'annuler. Pour remédier à ce problème, nous avons utilisé un protocole de silanisation⁶ inspiré de la littérature [87] et basé sur un traitement de la surface d'intérêt avec une solution de Sigmacote (Sigma). Le protocole développé est le suivant : la surface du microsystème est traitée par une solution NaOH à 0.1 M durant 15 min (étape de nettoyage préliminaire). Puis, la surface est lavée (eau DI/éthanol) et séchée. Enfin, la surface est traitée avec la solution de Sigmacote pendant 5 min avant d'être lavée et séchée. Ce traitement a atténué de manière remarquable l'adhérence des cellules.
- Deuxième problème : la difficulté à maîtriser le nombre de cellules qui se situent dans la zone d'intérêt (partie centrale de l'espace interélectrodes). Il faut un nombre suffisant de cellules pour pouvoir faire une moyenne, mais dans le même temps il ne faut pas que ces dernières soient trop proches les unes des autres.

Lors de nos expériences, nous avons pu observer que lorsque deux cellules étaient proches l'une de l'autre (quand la distance entre le contour extérieur d'une cellule et celui de sa voisine est inférieure au diamètre de la cellule) elles tournaient plus rapidement qu'une cellule isolée [88]. L'explication est qu'un couplage apparaît : les cellules se trouvant à proximité les unes des autres se polarisent mutuellement, ce qui crée un couple supplémentaire et change la vitesse de rotation des cellules. Ce phénomène a déjà été mis en évidence pour des billes en basse fréquence [89] ainsi que pour les cellules autour de quelques dizaines de kHz [90]

- Par ailleurs, en haute fréquence, les cellules ont tendance à migrer du centre vers les bords des électrodes, ce qui rend l'acquisition plus difficile voire impossible. Il s'agit du phénomène de diélectrophorèse, se manifestant en présence du champ électrique non uniforme. Or le champ produit par les électrodes n'est pas totalement uniforme quand on s'éloigne du centre (voir la simulation donnée figure 2.3). Cela peut fausser nos mesures. En effet, le champ électrique variant en fonction de la position à l'intérieur du microsystème, la vitesse de rotation des cellules et donc les spectres d'électrorotation varieront aussi suivant la position. Pour remédier à ce problème, seules les cellules situées au centre du microsystème ont été retenues. Par conséquent, le nombre

6. La silanisation consiste à rendre une surface hydrophile (le verre par exemple) hydrophobe en créant des liaisons entre l'eau et la surface d'intérêt

de cellules suivies en cours d'une expérience d'électrorotation est souvent inférieur à 5.

2.2 Résultats de mesure

2.2.1 Spectre d'électrorotation

La figure 2.8 montre le spectre d'électrorotation expérimental caractéristique construit à partir du suivi de 14 cellules. Les données ont été obtenues à partir de différentes expériences qui ont été réalisées en utilisant le même milieu de suspension. Sur cette figure, la vitesse de rotation et la barre d'erreur pour chaque point de fréquence correspondent respectivement à la moyenne des vitesses déterminées pour chacune des cellules et à l'écart type des vitesses de rotation.

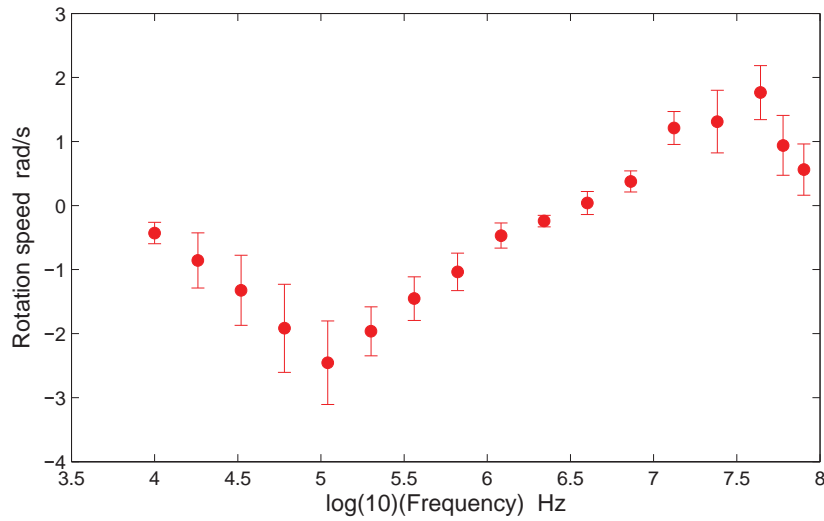


FIGURE 2.8 – Spectre d'électrorotation expérimental des cellule HEK 293, obtenu lors de nos expériences.

Le spectre obtenu a la même allure que le spectre théorique présenté dans le chapitre précédent. Il semble également en accord avec les mesures effectuées par Zimmermann et al. (voir Figure 2.9, "HEK control") pour le même type cellulaire dans un milieu d'électrorotation de conductivité 60 mS/m [91]. On rappelle que dans nos expériences la conductivité est de 50 mS/m. Cette légère différence de conductivité explique le léger décalage observé sur le pic basse fréquence dans [91]. En effet, l'influence de la conductivité du milieu d'immersion sur le spectre d'électrorotation a déjà été démontrée (Figure 2.10) : lorsque la conductivité du milieu est plus faible, le pic d'électrorotation en basse fréquence survient à une fréquence plus faible [92].

Le résultat de ces expériences semble donc correct.

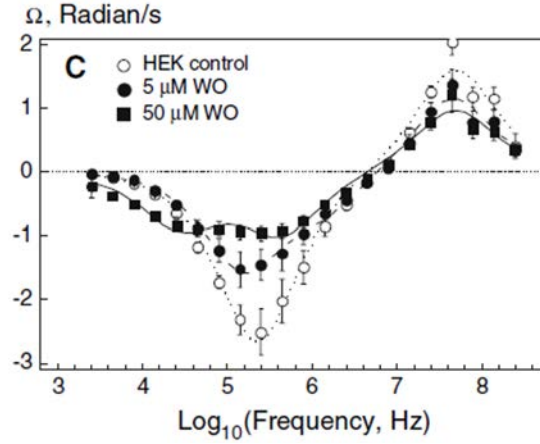


FIGURE 2.9 – Spectres d'électrorotation des cellules HEK témoin (o) et des cellules HEK traitées avec un anion lipophile (WO) [91].

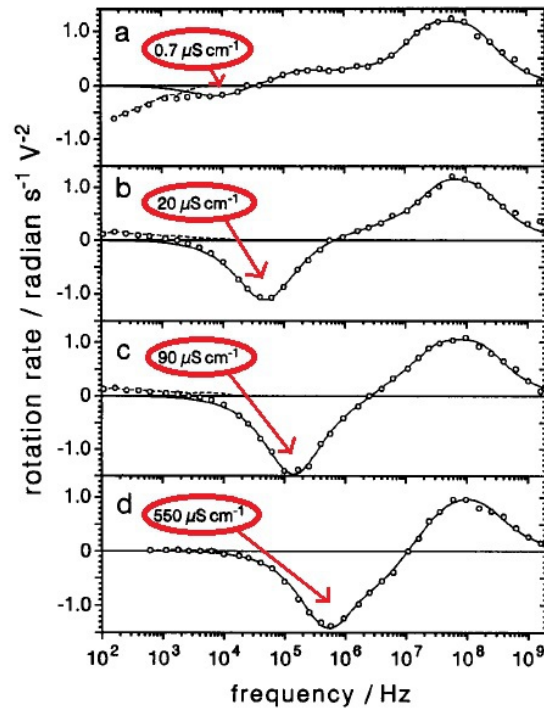


FIGURE 2.10 – Illustration de l'effet de la conductivité sur la fréquence du premier pic des spectres d'électrorotation de levures [92].

2.2.2 Identification des paramètres électriques

Afin d'extraire les paramètres électriques des cellules biologiques HEK 293, nous avons utilisé la méthode d'ajustement des moindres carrés sur Matlab. Cette méthode est basée sur la minimisation de l'erreur quadratique entre le spectre expérimental et le spectre théorique construit à partir de l'équation reliant la vitesse de rotation de la cellule à ses caractéristiques électriques (chapitre précédent). Rappelons que les paramètres que l'on cherche à identifier sont les caractéristiques électriques des cellules HEK 293 : la conductivité σ_c et la permittivité ϵ_c du cytoplasme ainsi que la conductance et la capacité spécifiques de la membrane cellulaire G_m et C_m . L'outil Matlab «cftool» (Curve fitting tool) a été utilisé pour effectuer l'identification : ce module permet d'une part de générer le spectre à partir de son équation théorique et d'autre part de définir un intervalle de variation pour chaque paramètre. L'ordre de grandeur de ces intervalles a été déterminé en se basant sur les valeurs existant dans la littérature. Le résultat de l'ajustement de la courbe (curve fitting) expérimentale est donné Figure 2.11.

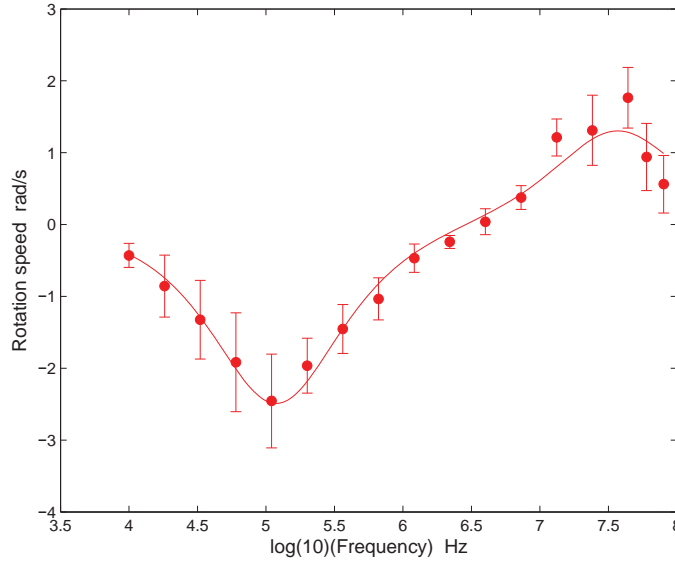


FIGURE 2.11 – Ajustement du spectre d'électrorotation moyen expérimental des cellules HEK 293.

Les paramètres électriques sont extraits pour chaque cellule en se basant sur l'ajustement de son spectre d'électrorotation (Figure 2.12). Nous avons obtenu autant de valeurs de paramètres qu'il y a de spectres de cellules. Des calculs de moyenne et d'écart type ont été effectués par la suite sur l'ensemble des paramètres identifiés.

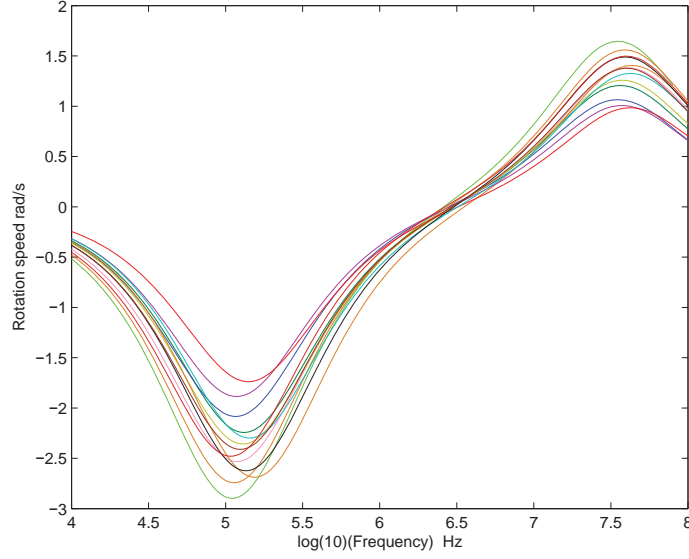


FIGURE 2.12 – Ajustements des spectres d’électrorotation expérimentaux des cellules HEK 293 (pour chaque cellule un ajustement du spectre d’électrorotation est effectué).

Les paramètres électriques identifiés sont présentés dans le tableau 2.1. Les valeurs obtenues sont en accord avec celles présentées par Zimmermann et al. [91] ainsi qu’avec celles d’autres types de cellules de mammifères [93] [94].

	σ_c (mS.m ⁻¹)	ϵ_c (F.m ⁻¹)	C_m (mF.m ⁻²)	G_m (S.m ⁻²)
HEK 293	408 ± 19	85 ± 4	7.9 ± 0.4	≈ 0
HEK 293 [91]	533 ± 63	71 ± 9	8.5 ± 0.3	≈ 0

TABLE 2.1 – Caractéristiques électriques des cellules HEK obtenues par électrorotation

2.3 Etude complémentaire

Dans ce chapitre, les caractéristiques électriques des cellules HEK 293 ont été déterminées par électrorotation. Cette caractérisation a permis de valider la démarche expérimentale, les résultats obtenus étant proches de ceux existant dans la littérature. L’électrorotation est largement utilisée pour suivre l’état physiologique des cellules ainsi que l’évolution de leurs propriétés électriques en réponse à divers

stimuli. Certains chercheurs ont ainsi étudié les modifications des propriétés électriques de la membrane plasmique des fibroblastes provoquées par leur infection avec les polyomavirus⁷ murins [95]; d'autres ont étudié les effets des nanoparticules métalliques internalisées par les cellules HL-60 (human promyelocytic leukemia cells) [96] sur leurs propriétés électriques, la différenciation des sous-populations de leucocytes [97], la détection de la présence de parasites (2.13) [98], etc. ...

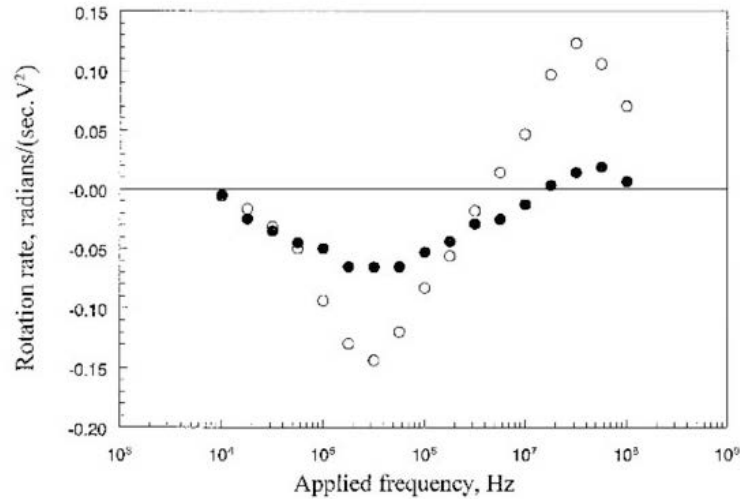


FIGURE 2.13 – Spectres d'électrorotation d'érythrocytes normaux (0) et d'érythrocytes infectés par le parasite *Plasmodium falciparum* [98].

Ces différents exemples montrent que la technique d'électrorotation est un bon outil pour détecter des changements physiologiques des cellules. C'est pour cette raison que nous avons effectué une étude complémentaire qui consiste à évaluer l'effet d'un champ magnétique statique de 0.5 T sur les cellules HEK 293. En effet, nous rappelons que cette thèse s'inscrit dans le cadre des travaux menés à Ampère autour de l'étude des interactions champ électromagnétique/vivant. Dans ce travail, nous avons comparé le spectre d'électrorotation des cellules HEK 293 exposées au champ magnétique à celui des cellules non exposées. Les résultats ont été confrontés à ceux obtenus par d'autres techniques de diagnostic tels que l'étude de prolifération des cellules et l'imagerie par microscopie électronique à balayage. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Biophysical Journal* figurant en annexe.

Ce chapitre nous a permis d'identifier les propriétés électriques des cellules HEK 293 isolées. Or, l'objectif à moyen terme de ce travail de thèse porte sur la mise en relation des propriétés d'une cellule individuelle et de celles d'un tissu. Une étape intermédiaire importante pour mener à bien ce travail d'homogénéisation consiste à

7. Ce sont des virus dont le génome est constitué d'ADN bicaténaire circulaire

former des groupes de cellules de taille contrôlée. Le chapitre suivant vise à présenter les approches explorées pour permettre l'obtention d'agrégats de cellules HEK 293.

Appendices

Assessment of 0.5 T Static Field Exposure Effect on Yeast and HEK Cells Using Electrorotation

Amal El-Gaddar,* M. Frénée-Robin, D. Voyer, H. Aka, N. Haddour, and L. Krähenbühl

Université de Lyon - CNRS UMR5005 (Laboratoire Ampère) - Université Claude Bernard Lyon 1 - École Centrale de Lyon (Ecully)

ABSTRACT This study aims to examine the influence of a 0.5 T static magnetic field (SMF) on yeast and human embryonic kidney (HEK) 293 cell using electrorotation (ROT). Following 48 h exposition to the SMF, no difference was noted between ROT spectra of unexposed and exposed yeast cells, which extend previous reports on the absence of SMF effects on yeast. We also compared the ROT spectrum and the extracted electrical characteristics of HEK cells exposed during 72 h to a 0.5 T uniform static magnetic field with those of unexposed cells. SMF potential effects on HEK proliferation kinetics and cell morphology were also assessed by using the trypan blue exclusion method and scanning electron microscopy, respectively. At last, no significant differences were observed between control and exposed HEK cells concerning electrical properties, growth, and morphology.

INTRODUCTION

A number of studies have been carried out over the last two decades to assess mechanisms through which static magnetic fields (SMF) may affect the human body. Indeed, although the use of such fields can be greatly beneficial, particularly in medicine, possible adverse health effects from exposure must be carefully evaluated so that the real risks and benefits can be assessed. For example, magnetic resonance imaging is increasingly used for the detection of abnormalities or lesions in most parts of the body, thanks to its multiplanar capabilities and sensitivity to tissue differentiation. Most magnetic resonance imaging scanners operate at field strength of 1.5 T, but 3T equipment is beginning to enter the clinical sphere, and this equipment promises faster scans and higher resolutions. Although many studies conclude that the effects of strong magnetic fields tend to be mild (1–3), this equipment proliferation still requires vigilance, and the current push to higher field strengths increases the need to understand the interactions between SMF and living matter. In the research agenda established by the World Health Organization (WHO) International project in 2006 (4), pointing out knowledge gaps that have to be filled for a proper risk assessment of SMF, it is recommended that in vitro studies be carried out to provide a better understanding of interaction mechanisms and to help identify the effects that need to be further investigated in vivo. The promising development of micromagnetic devices dedicated to cell manipulation is another argument for the need to conduct in vitro studies of SMF effects. In high intensity and high gradient magnetic fields, substantial forces can be exerted on diamagnetic objects such as water drops or living cells. In the past few years, new biochips, biosensors, and microfluidic systems (5) using such fields have been designed (6). Static fields generated by permanent micromag-

nets and microelectromagnets (7) are used in various biological applications including cell levitation (8), cell separation (9), and trapping. New improvements have recently been achieved in the development of high performance micromagnet arrays, which are now capable of generating magnetic flux densities as high as 1 T and field gradients $>10^6$ T/m (10,11). In the perspective of further lab-on-a-chip developments for clinical applications, SMF potential impact on cells needs to be properly assessed. The effects of field gradient have to be discriminated from those of level of exposure, i.e., field intensity. Many biological effects of SMF have already been studied in vitro on various cell models (bacteria, eukaryotic cells, cell fragments). The endpoints included cell growth (12–14), morphology, apoptosis (15), genotoxicity (16), orientation, metabolic activity (17), and gene expression (18). Whereas SMF exert little influence on cell growth and genetic toxicity (19), many studies report change in the orientation of cells and collagen fibers exposed to strong magnetic fields (20). The effects of SMF on membrane physiology are also widely investigated (21,22) through in vitro, theoretical, and computational studies, as membrane is the prime site for reception of external physical stimuli. Some research teams have proposed to monitor the evolution of membrane dielectric properties to assess the effect of exposure to magnetic fields, based on techniques such as impedancemetry or electrorotation (ROT). To our knowledge, previous studies of this kind were rather focused on extremely low frequency magnetic fields than on SMF. For example, Santini and co-workers (23) have demonstrated that both membrane conductivity and membrane permittivity of K562 leukemic cells decreased substantially after exposure of these cells to a 50 Hz 2.5 mT magnetic field whereas the conductivity of the cytosol remained unchanged. In their study, cell membrane electrical properties were obtained from conductivity measurements performed on the whole cell suspension between 10 and 100 kHz. In another study, a similar

Submitted October 3, 2012, and accepted for publication January 7, 2013.

*Correspondence: amal.el-gaddar@ec-lyon.fr

Editor: Jeffrey Fredberg.

© 2013 by the Biophysical Society
0006-3495/13/04/1805/7 \$2.00



decrease in both membrane permittivity and conductivity was observed on embryonic myoblasts exposed to a 50 Hz magnetic field with intensity ranging from 1 to 10 mT (24). The technique of ROT has also been extensively used to monitor the physiological state of cells as well as the evolution of cell dielectric properties in response to various stimuli (chemical, biological...) (25–27). In particular, Zhou and co-workers (28) did not observe any change in the rotational behavior of yeast cells exposed to 50 Hz, 8 and 80 μ T fields for periods up to 4 h. However, to the best of our knowledge, no other study has used this method to analyze the hypothetical effect of a magnetic field on cells. Such a technique appears to be particularly appropriate to detect potential changes induced in cell membrane physiology, as those changes would modify the antifield rotation peak observable on the ROT spectrum.

In this work, we propose to analyze the effects of a 0.5 T SMF on yeast cells and human embryonic kidney (HEK 293) cells using the ROT technique. Few authors were interested in studying the effect of static field on attached growing cells, whereas the majority of cells derived from biological tissues are adherent cells. This is why we focused our attention on adherent cells exposed to a static magnetic field. The choice of 0.5 T was motivated by the fact that this order of magnitude typically corresponds to the remanent magnetization of high quality permanent micromagnets (29). Moreover, the integration of yeast cells to this study was based on the existence of electrorotation data for these cells (30) and of numerous studies investigating SMF effects on yeast. HEK cell growth and viability have also been studied using the trypan blue exclusion. Potential morphology changes have also been tracked by scanning electron microscopy (SEM). To discriminate the effects of field gradient from those of field intensity, we used a permanent Halbach cylinder as the magnetic field source, which ensured the obtention of a uniform field and of reproducible exposure conditions.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and preparation

Yeast cells

Yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) from FALA (Strasbourg, France) were cultured at 29°C until the early stationary phase was reached, on YEPD agar plates (10 g/l of yeast extract, 10 g/l of peptone, 40 g/l of glucose, and 20 g/l agar, all from Sigma). Before the ROT experiments, cells were harvested, washed three times, and resuspended in a low conductive medium composed of distilled water supplemented with KCl. KCl addition allowed for the medium conductivity to adjust to the desired value (9 or 23 mS/m), using a multiparameter analyzer (Consort C532, Fischer Bioblock Scientific).

HEK cells

HEK 293 cells were obtained from Health Protection Agency Culture Collections, Salisbury, UK. The cell lines were grown at 37°C under 5%

CO₂ in Dulbecco's modified Eagle medium -high glucose- supplemented with 10% fetal calf serum, 100 μ g/ml streptomycin, and 100 units/ml penicillin. Cultures were transferred to fresh medium twice a week and thereby maintained in the exponential growth phase. Before being introduced into the ROT chamber, cells were detached with a trypsin solution (0.05% trypsin/0.02% EDTA in phosphate buffered saline) following a well-established detachment protocol. They were then washed and resuspended at a concentration of 3×10^5 cells/ml in a solution containing 5% dextrose in water. The conductivity was adjusted with phosphate buffered saline to 50 mS/m (31). Buffer osmolality was measured using a cryogenic osmometer (Löser, type 6) and found equal to 300 mOsm/kg. The solution had a final measured pH of 7.4.

Magnetic field exposure

The exposure source consisted of a Halbach cylinder (Magnetic Solutions), which is a special arrangement of permanent magnets producing a uniform field inside the cylinder and a zero field outside. Indeed, the hollow permanent magnet cylinder presented in Fig. 1 *a* produces a uniform 0.5 T magnetic field inside the bore. It features inner and outer diameters of 54 and 140 mm, respectively, and is 60 mm in height. The magnetic flux density distribution is shown in Fig. 1 *b*. The 0.5 T value was checked experimentally using a gaussmeter (LakeShore model 410). This value dropped slightly near the inner edge of the cylinder where it reached a value of 0.4 T. To investigate the effects of 0.5 T SMF on yeast and HEK 293 cells, a 35 \times 10 mm petri dish containing cells was placed in the middle of the Halbach cylinder, at midheight for 24, 48, or 72 h. As a control, a petri dish with similar cell content was kept in the same incubator, carefully placed away from the magnetic source. Moreover, to avoid possible bias linked to cell environment and obtain the same airflow around control and exposed samples, the control plate was inserted inside a plastic cylinder presenting the same geometry as the magnetic one.

Electrorotation measurement

ROT chamber and field generation

The ROT measurement system was composed of a quadrupole electrode array of polynomial geometry (32,33). These planar microelectrodes featured a tip-to-tip spacing of 400 μ m and were made of gold (100 nm) deposited on a glass substrate with a titanium adhesion layer. An adhesive silicone well of capacity 100 μ L was then held against the glass surface to create a flow chamber encompassing the electrode array. A glass coverslip placed on top of the solution-filled chamber allowed the prevention of any potentially disturbing fluid movement. During preliminary ROT experiments, it was observed that cells could stick to the glass surface, which hindered their rotation. To avoid this problem, the surface was silanized with Sigmacote (Sigma), following a protocol described in (34). A uniform rotating electric field was generated by supplying the electrodes with four 5Vpp sine waves in phase quadrature. The signals were provided by four waveform generators (Agilent 33250a) computer-controlled through their GPIB interface using Labview. ROT observations covered a frequency range from 10 to 80 MHz.

Data acquisition

Cell rotation images were obtained using a Zeiss AxioCam HSm charge-coupled device camera mounted on a Nikon LV 150 microscope. For each frequency point, a video sequence was acquired using the Zeiss AxioVision software. Cell rotation speed was measured from the acquired image sequences using the MATLAB Image Processing Toolbox (The MathWorks, Natick, MA). For each image of a sequence, edge-based segmentation was performed by using a canny edge detector followed by a hole-filling algorithm. The resulting binary images contained white pixels corresponding to cells and black pixels elsewhere. Small undesirable

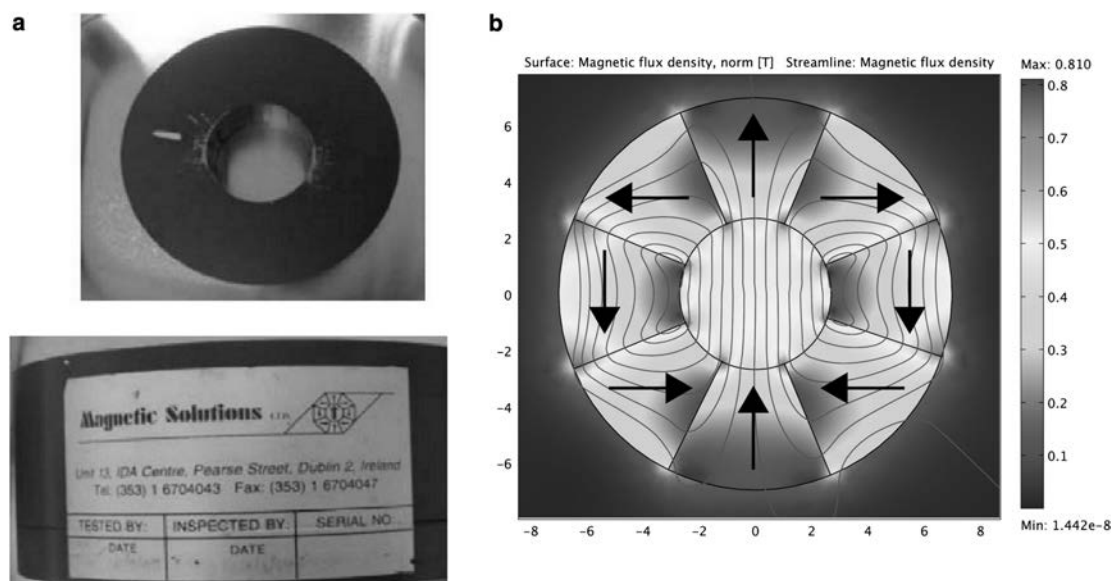


FIGURE 1 Halbach cylinder (Magnetic Solutions) producing a uniform 0.5 T magnetic field. (a) Top and side views of the Halbach cylinder. (b) Distribution of the magnetic flux density (2D FEM simulation performed with Comsol).

objects such as cell debris were then removed from the foreground using a morphological opening. The segmented cells were then labeled and a set of properties was extracted for each object, including area (i.e., number of pixels in the region), center of mass coordinates, major axis length, and orientation (defined as the angle between the x axis and the major axis of the ellipse delineating the region). According to these measures, objects were then classified into two categories: the first one included single isolated cells with matching features (diameter $\approx 10 \mu\text{m}$), which were candidates for ROT measurements. The second one encompassed cell aggregates, cells located at the image border or at its vicinity, and cells close to one another (distance $\leq 20 \mu\text{m}$), which had to be excluded from measurements to avoid discrepancies due to mutual polarization (35). Objects identified as appropriate candidates were tracked in the whole image sequence and rotation rates were deduced from orientation variations between consecutive frames.

SEM

Before SEM observation, cells were fixed with 4% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer. Samples were rinsed 3 times for 15 min with 0.2 M sodium cacodylate buffer. They were then dehydrated progressively in ethanol and passed through two hexamethyldisilazane baths. Samples were then sputter-coated with 8 nm platinum. Imaging was carried out using a Hitachi S800 FEG scanning electron microscope operated at 15 kV.

RESULTS AND DISCUSSION

Study of yeast cells using electrorotation

In preliminary control experiments, we analyzed cell rotational behavior of unexposed yeast cells at two distinct medium conductivities (9 and 23 mS/m). The corresponding ROT spectra are depicted in Fig. 2. Those results coincide well with those obtained by Hölzel (30), which shows the suitability of our setup. Both their frequency observations with an antifield peak position near 200 kHz and zero

crossing near 2 MHz are in good agreement with our findings at 9 mS/m. With increasing medium conductivity, these values shifted toward higher frequencies, which is also consistent with literature reports. To assess the potential effect of the 0.5 T SMF on yeast cells after 48 h exposure, ROT spectra of exposed and unexposed yeast were then compared (Fig. 3). Control and exposed samples showed similar responses, which tends to indicate that magnetic field exposure has no detectable effect on yeast dielectric properties. ROT spectra reflect morphology and composition of cell surface and interior, which therefore seem unaltered following SMF exposure. This finding is consistent with other observations. First, all the SMF exposed samples showed a viability rate of almost 100%, as checked using the trypan blue cell exclusion method. Anton-Leberre et al. (36) have also studied SMF effects on yeast and concluded that stronger fields (up to 16 T for 8 h) did not affect gene expression, proteome profile, cell viability, morphology, growth, or impaired metabolic and fermentation activities. Although it does not prove that there will not be any effect on the ROT

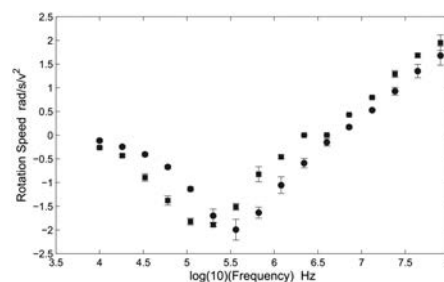


FIGURE 2 ROT spectra obtained for unexposed yeast cell using two different medium conductivities: 9 mS/m (square) and 23 mS/m (circle).

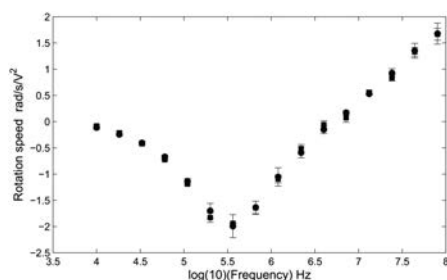


FIGURE 3 ROT spectra of exposed (*square*) and unexposed (*circle*) yeast cells. The medium conductivity was set to 23 mS/m (cumulative data, $n_{\text{cells}} = 10$).

spectrum for a 0.5 T SMF, one can reasonably assume that lowering the field intensity by a factor of 32 should provide similar results. Malko et al. (37) have also found no effect on the growth of yeast cells exposed to a 1.5 T MF produced by a magnetic resonance imager. Finally, in another study of magnetic field effects on yeast using electrorotation (28), Zhou et al. did not detect any change in ROT spectra following exposure to 50 Hz, 8 and 80 μT fields for periods up to 4 h. However, although we followed similar methodology, comparison with this last study is not straightforward, nor is it with the other two aforementioned ones, because different exposure conditions were used. Meanwhile, linking those results may at least give some trend information about magnetic field effects on yeast.

Study of SMF effects on HEK cells

Cell proliferation

Cell growth was studied by enumerating viable cells in the exposed and control samples after staining with trypan blue dye. The replication time of cells HEK 293 is 22 h and viable cell numbers were measured after 24, 48, and 72 h of incubation. The obtained data are expressed as mean SD calculated from triplicate cultures. The seeding cell number was set to 1.6×10^4 in all experiments. The results presented in Fig. 4 show no significant differences between the exposed and control groups with respect to cell proliferation.

ROT experiments

The ROT spectra of exposed and unexposed cells were obtained for 12 to 14 individual cells after 72 h of incubation. Data presented in Fig. 5 are compiled from different experiments, all performed using the same suspension medium, in which conductivity was set to 50 mS/m. According to Gascoyne et al. (31), such value may be considered as optimal for proper identification of cell electrical characteristics from their ROT spectrum. In particular, it was shown that when the conductivity increases to 50 mS/m, the sensitivity of the ROT spectrum to G_m decreases to allow the three remaining parameters to be obtained accurately.

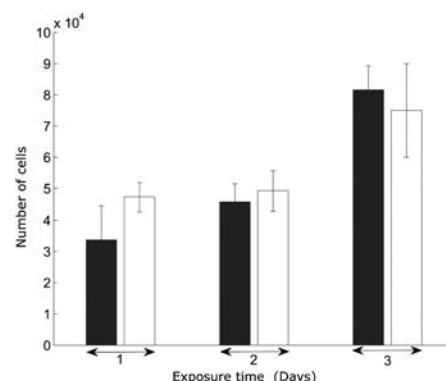


FIGURE 4 Comparison of cell counts in the exposed (*gray*) and control (*white*) samples after 24, 48, and 72 h of incubation. The initial cell number was set to 1.6×10^4 in all experiments.

ROT spectra of control HEK cells seem in good agreement with comparable measurements performed by Zimmermann et al. in a medium of conductivity 60 mS/m (39). The difference in buffer conductivity is consistent with the slight shift observed on the low-frequency peak, with respect to these previous data. In this study, the spectra obtained for both cell groups (exposed and control cells) are close to one another. A slight difference was observed on cell rotation rate around peak frequencies, but it should be relativized considering error bars. More importantly, no shift was observed on the antifield peak frequencies, as usually reported when the cell morphology is altered. The same remark applies to the cofield peak and zero crossing positions, which remain unchanged. Cell electric parameters were extracted using the least square fitting technique implemented with MATLAB. The equations presented in the Appendix were used to find C_m , G_m , σ_c , and ϵ_c values, based on the single-shell dielectric model of a spherical cell. These parameters respectively refer to cell area-specific membrane capacitance and conductance and to cytoplasm conductivity and permittivity. The fitted parameters are given in Table 1. No detectable difference was observed between C_m and G_m measured in exposed and unexposed cells, and the value is in very good agreement with those

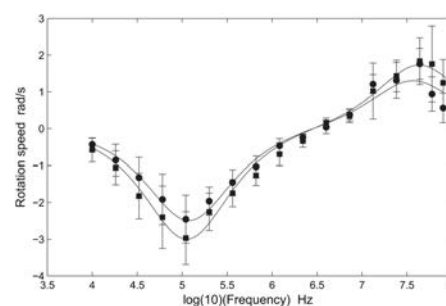


FIGURE 5 ROT spectra of exposed (*square*) and unexposed (*circle*) HEK cells. The solid line represents the fit to the experimental data compiled from nine experiments.

TABLE 1 Dielectric properties of membrane and cytoplasm for HEK control cells and cells exposed to the 0.5 T SMF during 72 h

	σ_c (mS.m ⁻¹)	ϵ_c (F.m ⁻¹)	C_m (mF.m ⁻²)	G_m (S.m ⁻²)
Unexposed HEK	408 ± 19	85 ± 4	7.94 ± 0.4	≈ 0
Exposed HEK	470 ± 31	84 ± 4	8.56 ± 0.6	≈ 0

σ_c and ϵ_c represent the cytoplasm conductivity and permittivity. C_m and G_m refer to the area-specific membrane capacitance and conductance.

previously obtained for HEK cells (39) and for other mammalian cell types (40,41). σ_c and ϵ_c values are also rather consistent with values reported by Zimmermann et al. (39), despite a larger ϵ_c value obtained in our study for unexposed cells. However, considering error bars around the cofield rotation peak, such discrepancy has to be interpreted cautiously.

Analysis of SEM micrographs

The results presented in the previous section led to the assumption that cell membrane topography remained unaltered following magnetic field exposure, because similar C_m values were measured for exposed and unexposed cells. Many studies have shown that C_m variations following specific cell treatment could be related to changes in cell membrane surface morphology (42,43). Indeed, formation of membrane protrusions such as microvilli (44) results in an increase of cell surface area inducing an increase of C_m value (41). The evolution of the cell membrane morphology has been studied by performing SEM observations at different moments of the culture process for the exposed and unexposed cells. The images taken after 24, 48, and 72 h reveal no evident change in cell surface morphology between

both cell samples (Fig. 6). Whereas membrane surfaces of unexposed and exposed cells presented similar aspects, we could observe a parallel increase in the number of microvilli with time. Such alterations of cell surface are expected to increase further after a few days of cell culture (45).

CONCLUSION

This study aimed at assessing the potential effects of a moderate intensity SMF on biological cells using electro-rotation. To perform ROT measurements under reproducible experimental conditions, we used a well-characterized exposure source producing a uniform magnetic field. ROT spectra obtained for exposed and unexposed yeast cells were perfectly matched, and were in good agreement with previously reported data. After these preliminary validation experiments, we performed similar measurements on human cells. HEK 293 dielectric parameters were extracted from their ROT spectra. The specific membrane capacitance values obtained for exposed and control cell samples were similar, which suggested that membrane topography was not altered following field exposure, as confirmed with SEM observations. As a perspective of this work, we plan to evaluate the effect of field gradients by constructing an exposure system of appropriate design. We also intend to assess cumulative effects of chemical and magnetic field exposures using electrorotation.

APPENDIX: ELECTROROTATION THEORY

Under the applied electric field, a particle undergoes a torque (46):

$$\vec{\Gamma} = -4\pi\epsilon_m r^3 \text{Im}[K(\omega)] E_0^2 \vec{k}, \quad (1)$$

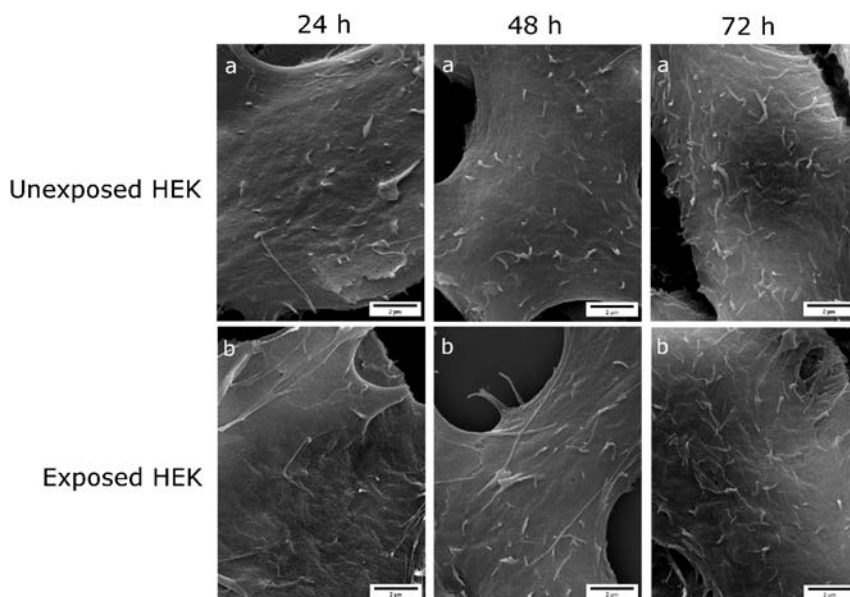


FIGURE 6 Analysis of cell membrane morphology (magnification = ×10,000). Comparison of SEM microphotographs after 24, 48, and 72 h of incubation for unexposed (a) and exposed (b) HEK 293 cells.

where r , ω , \vec{E} , and ϵ_m represent cell radius, angular frequency, RMS intensity of the applied electric field and buffer permittivity. $K(\omega)$ the Clausius-Mossotti factor (47):

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*}, \quad (2)$$

$$\epsilon_{p,m}^* = \epsilon_{p,m} - j \frac{\sigma_{p,m}}{\omega}, \quad (3)$$

where ϵ_p , ϵ_m , σ_p , and σ_m represent respectively the particle and buffer permittivities and conductivities. By using the so-called single-shell dielectric model (48), the expression of ϵ_p^* , which represents the effective complex cell permittivity can be written as (48,49):

$$\epsilon_p^* = \frac{\left(C_m + \frac{G_m}{j\omega}\right)r \times \left(\epsilon_0\epsilon_{rc} + \frac{\sigma_c}{j\omega}\right)}{\left(C_m + \frac{G_m}{j\omega}\right)r + \left(\epsilon_0\epsilon_{rc} + \frac{\sigma_c}{j\omega}\right)}, \quad (4)$$

where σ_c and ϵ_{rc} represent conductivity and relative permittivity of the cytoplasm. G_m ($G_m\sigma_m/d$ ($S.m^{-2}$)) where d is the membrane thickness and C_m ($C_m\epsilon_m/d$ ($F.m^{-2}$)) refer to area-specific membrane capacitance and conductance.

Particle rotation speed can be expressed as follows (31):

$$\Omega(\omega) = -\frac{\epsilon_m \text{Im}[K(\omega)]E_0^2}{2\eta} = -\chi \text{Im}[K(\omega)](\text{rad.s}^{-1}), \quad (5)$$

where η is the buffer viscosity.

The authors thank Orphee Cugat for lending us the Halbach cylinder, Laure Franqueville for her valuable advice and guidance concerning cell culture, and Technological center of Microstructures UCB Lyon1 for SEM preparation and observation.

We also thank the French Research Ministry and the GDR SEEDS for the financial support provided including the PhD grant of A.E.-G.

REFERENCES

- Schenck, J. F. 2000. Safety of strong, static magnetic fields. *J. Magn. Reson. Imaging*. 12:2–19.
- Schenck, J. F. 2005. Physical interactions of static magnetic fields with living tissues. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 87:185–204.
- Miyakoshi, J. 2005. Effects of static magnetic fields at the cellular level. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 87:213–223.
- World Health Organization (WHO). 2006. Static Fields: Environmental Health Criteria. World Health Organization, Geneva.
- Inglis, D., R. Riehn, ..., R. Austin. 2006. Microfluidic high gradient magnetic cell separation. *J. Appl. Phys.* 99: 08K101–08K101.
- Pamme, N. 2006. Magnetism and microfluidics. *Lab Chip*. 6:24–38.
- Lee, H., A. Purdon, and R. Westervelt. 2004. Micromanipulation of biological systems with microelectromagnets. *IEEE Trans. Magn.* 40:2991–2993.
- Winkleman, A., K. Gudiksen, ..., M. Prentiss. 2004. A magnetic trap for living cells suspended in a paramagnetic buffer. *Appl. Phys. Lett.* 85:2411–2413.
- Xia, N., T. P. Hunt, ..., D. E. Ingber. 2006. Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow. *Biomed. Microdevices*. 8:299–308.
- Pivetal, J., O. Osman, ..., N. Haddour. 2010. Trapping of magnetically-labelled liposomes on flat micro-patterned hard magnetic films. *AIP Conf. Proc.* 1311:192–197.
- Osman, O., L. F. Zanini, ..., N. Haddour. 2012. Monitoring the endocytosis of magnetic nanoparticles by cells using permanent microflux sources. *Biomed. Microdevices*. 14:947–954.
- Raylman, R. R., A. C. Clavo, and R. L. Wahl. 1996. Exposure to strong static magnetic field slows the growth of human cancer cells in vitro. *Bioelectromagnetics*. 17:358–363.
- Ruiz-Gómez, M. J., M. I. Prieto-Barcia, ..., M. Martínez-Morillo. 2004. Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry*. 64:151–155.
- Egami, S., Y. Naruse, and H. Watarai. 2010. Effect of static magnetic fields on the budding of yeast cells. *Bioelectromagnetics*. 31:622–629.
- Dini, L., and L. Abbato. 2005. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron*. 36:195–217.
- McCann, J., F. Dietrich, and C. Rafferty. 1998. The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. *Mutat. Res.* 411:45–86.
- Sabo, J., L. Mirossay, ..., J. Mojzis. 2002. Effects of static magnetic field on human leukemic cell line HL-60. *Bioelectrochemistry*. 56: 227–231.
- Hirose, H., T. Nakahara, ..., J. Miyakoshi. 2003. Static magnetic field with a strong magnetic field gradient (41.7 T/m) induces c-Jun expression in HL-60 cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 39:348–352.
- Silva, A. K. A., E. L. Silva, ..., A. S. Carriço. 2006. Safety concerns related to magnetic field exposure. *Radiat. Environ. Biophys.* 45: 245–252.
- Miyakoshi, J. 2006. The review of cellular effects of a static magnetic field. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 7:305–307.
- Chionna, A., M. Dwikat, ..., L. Dini. 2003. Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure. *Eur. J. Histochem.* 47:299–308.
- Teodori, L., M. C. Albertini, ..., A. Accorsi. 2006. Static magnetic fields affect cell size, shape, orientation, and membrane surface of human glioblastoma cells, as demonstrated by electron, optic, and atomic force microscopy. *Cytometry A*. 69:75–85.
- Santini, M., C. Cametti, ..., W. Malorni. 1995. A 50 Hz sinusoidal magnetic field induces changes in the membrane electrical properties of K562 leukemic cells. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 36:39–45.
- Grandolfo, M., M. T. Santini, ..., P. L. Indovina. 1991. Non-linear dependence of the dielectric properties of chick embryo myoblast membranes exposed to a sinusoidal 50 Hz magnetic field. *Int. J. Radiat. Biol.* 60:877–890.
- Berardi, V., C. Aiello, ..., G. Risuleo. 2009. Alterations of the plasma membrane caused by murine polyomavirus proliferation: an electrorotation study. *J. Membr. Biol.* 229:19–25.
- Chuang, C. H., Y. M. Hsu, and C. C. Yeh. 2009. The effects of nanoparticles uptake by cells on electrorotation. *Electrophoresis*. 30: 1449–1456.
- Hu, Q., O. Fadiran, ..., R. Joshi. 2010. Dielectrophoresis and electrorotation of spheroidal cells after nsPEF induced electroporation. *Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE), 4th International Conference (IEEE)*. 1–4.
- Zhou, X. F., J. P. Burt, and R. Pethig. 1998. Automatic cell electrorotation measurements: studies of the biological effects of low-frequency magnetic fields and of heat shock. *Phys. Med. Biol.* 43:1075–1090.
- Frenea-Robin, M., H. Chetouani, ..., G. Reyne. 2008. Contactless diamagnetic trapping of living cells onto a micromagnet array. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2008:3360–3363.
- Hölzel, R. 1997. Electrorotation of single yeast cells at frequencies between 100 Hz and 1.6 GHz. *Biophys. J.* 73:1103–1109.
- Gascoyne, P., F. Becker, and X. Wang. 1995. Numerical analysis of the influence of experimental conditions on the accuracy of dielectric parameters derived from electrorotation measurements. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 36:115–125.
- Huang, Y., and R. Pethig. 1991. Electrode design for negative dielectrophoresis. *Meas. Sci. Technol.* 2:1142–1146.

33. Hughes, M., X. Wang, ..., R. Pethig. 1994. Computer-aided analyses of electric fields used in electrorotation studies. *J. Phys. D Appl. Phys.* 27:1564–1570.
34. Krylov, S. N., and N. J. Dovichi. 2000. Single-cell analysis using capillary electrophoresis: influence of surface support properties on cell injection into the capillary. *Electrophoresis*. 21:767–773.
35. Sancho, M., G. Martinez, S. Muoz, J. L. Sebastin, and R. Pethig. 2010. Interaction between cells in dielectrophoresis and electrorotation experiments. *Biomicrofluidics*. 4: 022802-1-022802-11.
36. Anton-Leberre, V., E. Haanappel, ..., J. M. François. 2010. Exposure to high static or pulsed magnetic fields does not affect cellular processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectromagnetics*. 31:28–38.
37. Malko, J. A., I. Constantinidis, ..., W. A. Fajman. 1994. Search for influence of 1.5 Tesla magnetic field on growth of yeast cells. *Bioelectromagnetics*. 15:495–501.
38. Reference deleted in proof.
39. Zimmermann, D., M. Kiesel, ..., V. L. Sukhorukov. 2008. A combined patch-clamp and electrorotation study of the voltage- and frequency-dependent membrane capacitance caused by structurally dissimilar lipophilic anions. *J. Membr. Biol.* 221:107–121.
40. Gentet, L. J., G. J. Stuart, and J. D. Clements. 2000. Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. *Biophys. J.* 79: 314–320.
41. Ratanachoo, K., P. Gascoyne, and M. Ruchirawat. 2002. Detection of cellular responses to toxicants by dielectrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta. (BBA). Biomembranes*. 1564:449–458.
42. Wang, X., F. Becker, and P. Gascoyne. 2002. Membrane dielectric changes indicate induced apoptosis in HL-60 cells more sensitively than surface phosphatidylserine expression or DNA fragmentation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1564:412–420.
43. Pethig, R., V. Bressler, ..., K. M. Tate. 2002. Dielectrophoretic studies of the activation of human T lymphocytes using a newly developed cell profiling system. *Electrophoresis*. 23:2057–2063.
44. DeMali, K. A., and K. Burridge. 2003. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J. Cell Sci.* 116:2389–2397.
45. Kurejová, M., B. Uhrík, ..., L. Lacinová. 2007. Changes in ultrastructure and endogenous ionic channels activity during culture of HEK 293 cell line. *Eur. J. Pharmacol.* 567:10–18.
46. Hughes, M. 2003. *Nanoelectromechanics in Engineering and Biology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
47. Jones, T. 2005. *Electromechanics of Particles*. Cambridge University Press, New York.
48. Irimajiri, A., T. Hanai, and A. Inouye. 1979. A dielectric theory of “multi-stratified shell” model with its application to a lymphoma cell. *J. Theor. Biol.* 78:251–269.
49. Wang, X., M. Hughes, ..., P. Gascoyne. 1995. Non-uniform spatial distributions of both the magnitude and phase of AC electric fields determine dielectrophoretic forces. *Biochim. Biophys. Acta*. 1243: 185–194.

Chapitre 3

Formation d'agrégats de cellules HEK

Dans le chapitre précédent, nous avons caractérisé les propriétés électriques des cellules HEK 293 provenant de reins d'embryons humains. Dans l'optique de mieux appréhender les propriétés électriques des tissus épithéliaux et dans une démarche d'homogénéisation visant à mieux comprendre le lien entre cellules et tissus, nous souhaitons à présent caractériser des agrégats de cellules formés à partir de ces mêmes cellules HEK. Pour créer ces agrégats, deux techniques ont été mises en œuvre :

- la première est basée sur la nature des jonctions cellulaires. Elle consiste à exploiter la dépendance au calcium des jonctions adhérentes. En effet, cette jonction assure l'attachement mécanique des cellules entre elles en établissant des liaisons entre les cytosquelettes des cellules de même type. Ces liaisons s'établissent grâce aux protéines transmembranaires telles que la E-Cadhérine [61]. Le choix de reproduire cette jonction est basé sur le rôle important que joue cette dernière dans la tenue mécanique d'un tissu et sur le fait qu'elle soit contrôlable en jouant sur la concentration du calcium [63].
- La deuxième méthode utilise la manipulation des cellules biologiques sous l'effet d'un champ électrique non uniforme. Plus précisément, nous allons utiliser la force de diélectrophorèse pour l'assemblage des cellules en agrégats. Parmi les différentes géométries d'électrodes classiquement employées pour la manipulation de micro-objets par diélectrophorèse (DEP), notre choix s'est arrêté sur l'emploi d'une structure quadripolaire, permettant de focaliser efficacement les cellules au centre de l'espace inter électrode sous l'effet de la DEP négative. Afin de former plusieurs agrégats de cellules simultanément, une technique de fabrication de réseaux d'électrodes quadripolaires a été mise au point. Elle fera l'objet d'une description détaillée dans ce chapitre. Enfin, nous présenterons les conditions expérimentales employées pour aboutir à la formation d'agrégats permanents de cellules, de taille et de forme régulière.

3.1 Exploitation de la dépendance au calcium des jonctions adhérentes.

3.1.1 Technique

Afin de créer des agrégats de cellules HEK 293, nous nous sommes basés sur un protocole issu de la littérature. Dans les travaux décrits dans [99], la culture de cellules HEK 293 est effectuée pendant 72 heures en suspension. Cela permet d'éviter l'adhérence des cellules sur la surface pour favoriser plutôt l'adhérence entre cellules (formation d'agrégats). Concrètement, la culture cellulaire est réalisée dans des bouteilles en verre équipées d'un agitateur magnétique rotatif "Spinner bottles", avec une concentration en Ca^{2+} de $0.2 \cdot 10^{-3}$ mol/l et une agitation magnétique réglée à la vitesse de 60 tr/min. N'ayant pas la possibilité d'employer un appareil électrique dans notre incubateur, nous avons adapté le protocole ci-dessus, comme décrit dans ce qui suit.

3.1.2 Protocoles développés et résultats

Deux protocoles ont été développés. Le premier se déroule de la façon suivante :

1. Les cellules sont mises en culture pendant 72 heures dans des flasques de surface 25 cm^2 avec bouchon filtrant (PAA70025X). La culture est effectuée à l'intérieur de l'incubateur réglé à 37°C avec 5% de CO_2 .
2. Les cellules cultivées sont récoltées en centrifugeant la suspension cellulaire. Ensuite, $3 \cdot 10^5$ cellules/mL en suspension dans le milieu de culture, sont mises dans une bouteille de 10 mL, avec une concentration en Ca^{2+} de $0.2 \cdot 10^{-3}$ mol/L (les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule Malassez). La concentration de calcium souhaitée est obtenue en ajoutant du PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10X, Sigma) au milieu de culture. Le PBS utilisé contient 0,362 g/l de calcium, la masse molaire du calcium est de 40 g/mol, la concentration du calcium est donc de $9 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Pour préparer une solution de volume final 3 ml et de concentration en calcium égale à $0.2 \cdot 10^{-3}$ mol/L, nous rajoutons $66 \mu\text{l}$ de PBS.
3. L'étape finale consiste à placer la bouteille contenant les cellules sur un agitateur thermique/magnétique réglé à la température de 37°C et à une vitesse de rotation de 60 tr/min.

Afin d'optimiser la création des agrégats, plusieurs expériences ont été effectuées en jouant sur deux paramètres : la concentration du Ca^{2+} et la durée d'agitation. Le tableau 3.1 résume l'ensemble des tests effectués.

Vitesse d'agitation (tr/min)	Concentration [HEK293] (cellule/mL)	Concentration [Ca ²⁺] 10 ⁻³ (mol/L)	Durée d'agitation (min)
60	3.10 ⁵	0.2	20
			30
			60
		0.4	20
			30
			60

FIGURE 3.1 – Tests effectués pour optimiser la création des agrégats de cellules.

La figure 3.2 donne le résultat de ces expériences. Elle présente les photographies sous microscope des agrégats formés dans leur milieu de culture. On constate que pour une même concentration en calcium, la taille des agrégats formés ne varie pas beaucoup pour des durées d'agitation de 20 min et de 30 min. En revanche, pour une durée de 60 min, la taille des agrégats augmente considérablement. Par ailleurs, elle augmente également avec la concentration en calcium.

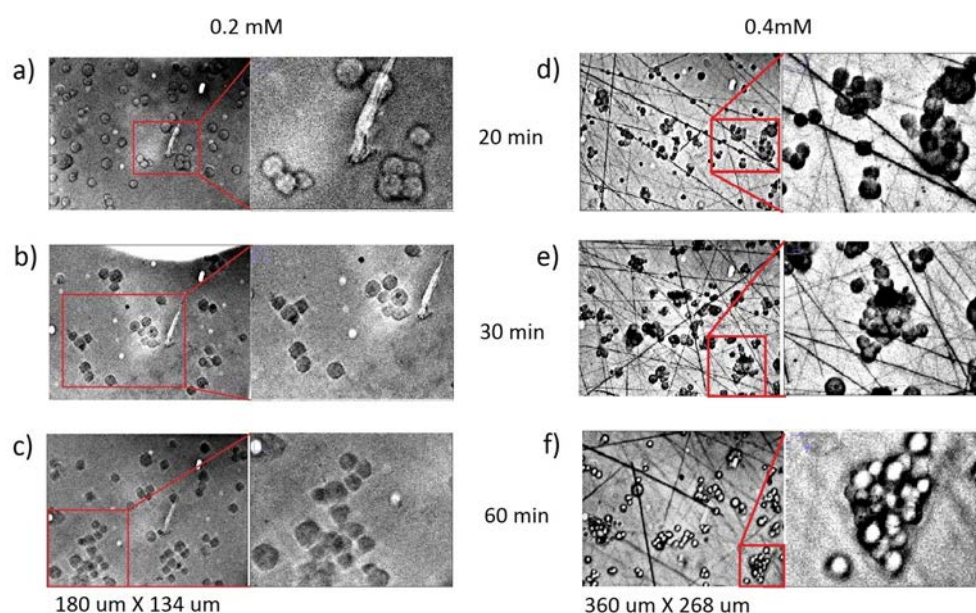


FIGURE 3.2 – Formation des agrégats de cellules HEK 293. Sur les images de gauche (a, b et c), $[Ca^{2+}] = 0.2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ et pour celles de droite (d, e et f) $[Ca^{2+}] = 0.4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$. La durée d'agitation est de 20 min pour les images du haut (a et d), 30 min pour celles du milieu (b et e) et 60 min pour celles du bas (c et f).

Si on souhaite obtenir des agrégats de taille importante (environ une centaine de cellules), il est donc préférable de travailler avec une concentration en calcium de $0.4 \cdot 10^{-3}$ mol/L et une durée d'agitation de 60 min. Cependant, ces deux conditions peuvent poser problème. En effet, l'agitateur thermique étant utilisé en dehors de l'incubateur, les cellules seront maintenues pendant 60 min dans un environnement non approprié (sans CO_2) : cela peut agir sur les propriétés des cellules ainsi que sur leur viabilité.

Par ailleurs, l'objectif étant de caractériser électriquement les agrégats de cellules, il serait préférable de former les agrégats directement dans le milieu d'électrorotation. Cependant, la présence des ions calcium modifie la conductivité du milieu d'électrorotation : il faut précisément quantifier cet effet afin d'éviter toute élévation de température dans le microsystème. Le choix de la conductivité conditionne aussi l'obtention d'un spectre exploitable (présentant des "pics" correspondant aux différentes relaxations. Des mesures ont donc été effectuées dans le milieu d'électrorotation. Les résultats des tests sont présentés dans le tableau 3.1. On constate que la conductivité du milieu d'électrorotation varie faiblement en fonction de la concentration de Ca^{2+} . Il est donc tout à fait possible de travailler à $0.4 \cdot 10^{-3}$ mol/L.

Concentration du Ca^{2+} (mM)	0	0.2	0.4
Conductivité du milieu (mS/m)	56.6	59.6	61.6

TABLE 3.1 – Conductivité du milieu d'électrorotation en fonction de la concentration du Ca^{2+} . Les mesures de la conductivité ont été réalisées à l'aide du conductimètre (CONSORT C532) avec un volume de solution de 10 mL pour toutes les mesures.

Afin de créer des agrégats dans le milieu d'électrorotation, le protocole décrit au début de ce paragraphe a été suivi en remplaçant le milieu de culture par le milieu d'électrorotation (eau DI avec 5% de dextrose). Toutefois, il n'y a pas eu de formation d'agrégats. Il est probable que la cellule qui se trouve dans un milieu ne contenant pas les protéines et vitamines nécessaires pour sa survie, se comporte différemment. En effet, l'absence de milieu de culture peut empêcher l'expression de protéines impliquées dans l'agrégation des cellules.

Une solution simple pour remédier à ce problème est de former les agrégats dans le milieu de culture. Ces agrégats sont ensuite récoltés par centrifugation avant d'être resuspendus dans le milieu d'électrorotation. Cette solution n'est pas très efficace car après la centrifugation, on ne conserve que quelques agrégats (on en perd d'autant plus que l'on doit centrifuger deux fois pour éliminer toute trace du milieu de

culture). Différentes vitesses et durées de centrifugation ont été testées mais les résultats n'étaient pas très satisfaisants.

Pour améliorer les résultats, un deuxième protocole a été développé sur le même principe que le premier, à ceci près que cette fois-ci les agrégats sont formés dans l'incubateur afin de bénéficier d'un environnement viable pour les cellules. Le protocole développé est le suivant :

- Les cellules sont mises en culture pendant 72 heures dans des flasques 25 cm^2 avec bouchon filtrant (PAA70025X). La culture s'effectue à l'intérieur de l'incubateur réglé à $37^\circ C$ avec 5% de CO_2 .
- Une partie des cellules cultivées est récoltée : $3 \cdot 10^5$ cellules/mL dans un volume total de 3 mL avec une concentration en Ca^{2+} donnée dans des boîtes de culture qui ne permettent pas l'adhérence cellulaire (il s'agit de boîtes qui ne sont pas traitées pour favoriser cette dernière).
- Ces boîtes sont placées dans l'incubateur réglé à $37^\circ C$ avec 5% de CO_2 pendant 24h.

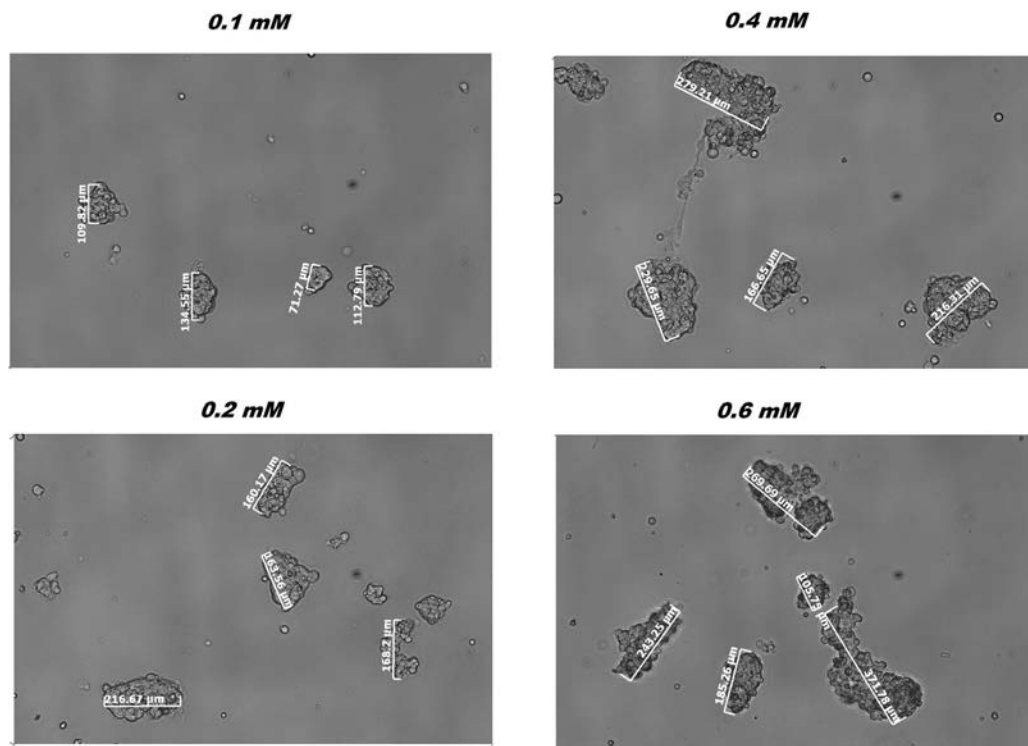


FIGURE 3.3 – Formation des agrégats de cellules en fonction de la concentration du calcium. Les images comportent une indication de la taille des agrégats en μm .

La figure 3.3 montre les agrégats obtenus pour différentes concentrations en calcium, comprises entre $0.1 \cdot 10^{-3}$ mol/L et $0.6 \cdot 10^{-3}$ mol/L. On constate que la taille

des agrégats augmente avec la concentration en calcium du milieu de culture. On peut aussi remarquer que, comparés à ceux obtenus quand on suit le premier protocole, les agrégats sont de taille plus importante et sont plus nombreux. Pour une concentration de $0.2 \cdot 10^{-3}$ mol/L, le premier protocole donne des agrégats de quelques cellules et on voit sur les images de la figure 3.2 que les agrégats ne sont pas très compacts, d'où leur dislocation à l'issue de l'étape de centrifugation. En revanche, pour la même concentration en calcium, le deuxième protocole conduit à des agrégats de taille plus importante avec des cellules bien liées les unes aux autres : après deux centrifugations, on conserve les agrégats. Ainsi, le fait de maintenir les cellules dans leur milieu de culture, dans l'incubateur, permet de former des agrégats de plus grande taille et plus rigides.

La figure 3.4 montre l'évolution du diamètre des agrégats en fonction de la concentration en calcium. Cette courbe a été obtenue en faisant un calcul statistique du diamètre des agrégats sur trente échantillons pour chaque concentration. On constate que l'écart type est plus important pour les concentrations en calcium élevées. Pour maîtriser la taille des agrégats, il est donc préférable de travailler à faible concentration. À $0.1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, l'écart type est relativement faible comparé aux autres concentrations. Par ailleurs, c'est à cette concentration que les agrégats obtenus sont les plus compacts. Ces deux critères nous conduisent à choisir une concentration en calcium de $0.1 \cdot 10^{-3}$ mol/L pour le protocole.

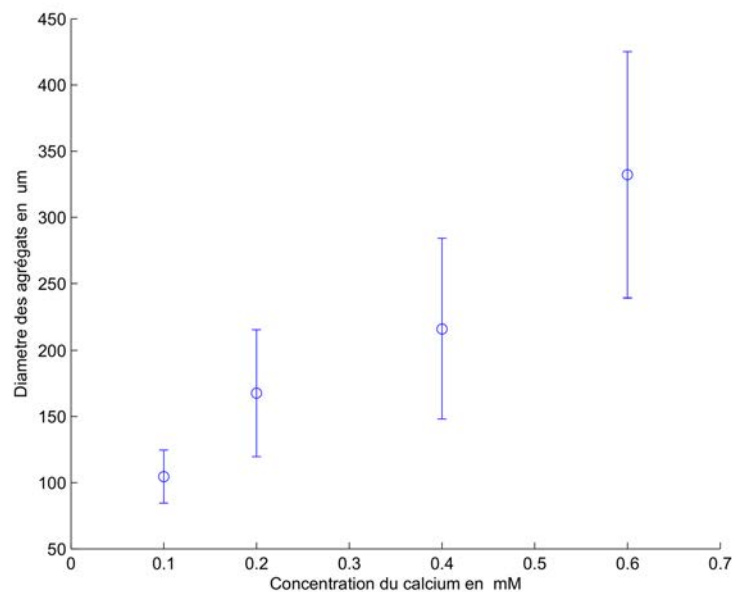


FIGURE 3.4 – Diamètre des agrégats en fonction de la concentration en calcium du milieu de culture.

3.2 Utilisation du champ électrique

La diélectrophorèse est une technique de manipulation de particules très largement employée [30] [100] [101] [102] [103]. Le terme "diélectrophorèse" désigne le déplacement d'une particule polarisée sous l'effet d'un champ électrique non uniforme. Dans le cas de la diélectrophorèse positive, les particules sont attirées vers les zones où le champ électrique est maximum (sur les électrodes). En revanche, la diélectrophorèse négative permet de confiner les particules dans une position stable, loin des électrodes (zone où le champ est minimum) (Figure 3.5).

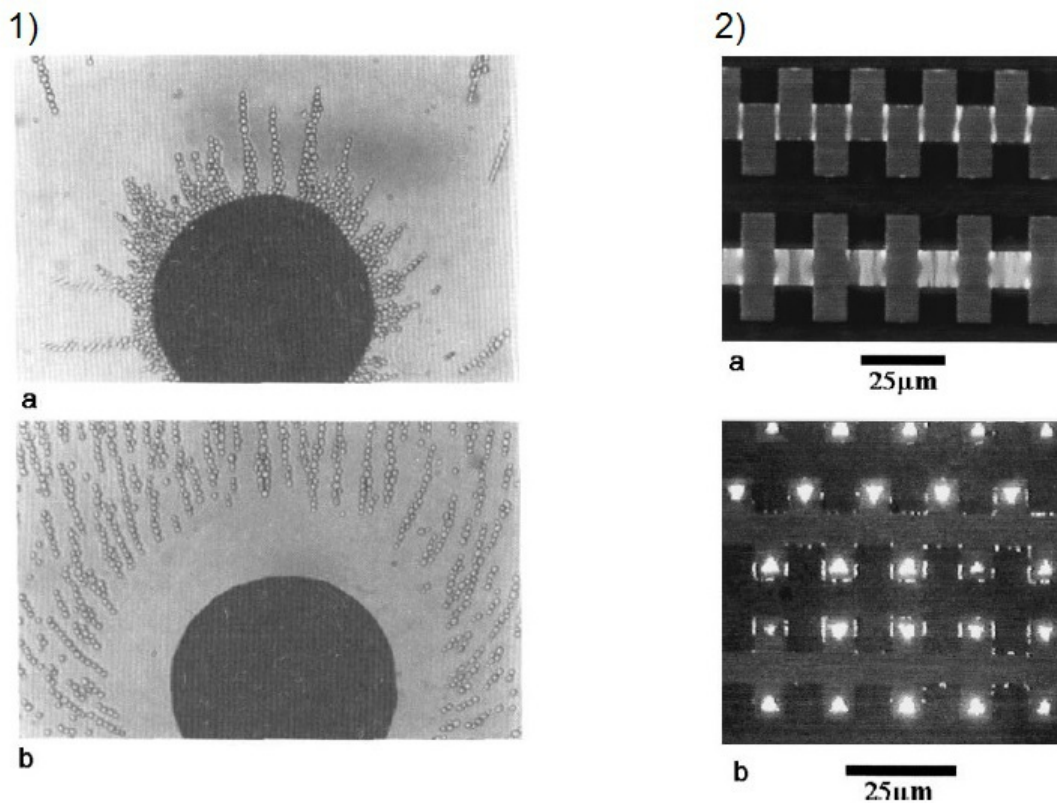


FIGURE 3.5 – Exemples de manipulation de particules par force diélectrophorétique. 1) : (a) Des levures en suspension dans un milieu de conductivité 40mS/m, attirées sur l'électrode par diélectrophorèse positive ($f=10$ MHz) (b) repoussées de l'électrode par diélectrophorèse négative ($f=1$ kHz) [104]. 2) : (a) Image montrant des billes en Latex dans un milieu de conductivité $250 \mu\text{S/m}$, attirées sur les électrodes par diélectrophorèse positive ($f=1$ MHz) (b) confinées dans des zones triangulaires correspondant aux régions de faible intensité de champ électrique (cas d'électrodes rectangulaires interdigitées $f=6$ MHz) [105].

Le déplacement des particules est dû à la force diélectrophorétique qui s'exprime ainsi [41] :

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Re}[K(\omega)] \nabla |E_{rms}|^2 \quad (3.1)$$

r , ω et E_{rms} représentent le rayon de la particule, la pulsation et l'intensité efficace du champ électrique appliqué.

$K(\omega)$ est le facteur de Clausius-Mossotti défini au chapitre I, qui dépend des propriétés diélectriques de la particule et du milieu ainsi que de la fréquence du champ appliqué. Pour des particules plus polarisables que leur milieu de suspension : $\text{Re}[K(\omega)]$ est positive, les particules se dirigent donc vers les zones où le champ est maximum et s'accumulent sur les bords des électrodes sous l'effet de la diélectrophorèse positive. À l'inverse, dans le cas de la diélectrophorèse négative, les particules sont moins polarisables que leur milieu de suspension ($\text{Re}[K(\omega)]$ négative), la force dirige la particule dans le sens des intensités de champ décroissantes (à l'opposé du gradient). La figure 3.6 illustre les phénomènes de diélectrophorèse positive et négative.

La manipulation des particules dépend donc de deux paramètres importants : la répartition du champ électrique déterminée par la géométrie des électrodes utilisées et le facteur de Clausius-Mossotti (déterminé notamment par la composition du milieu et la fréquence du champ appliqué).

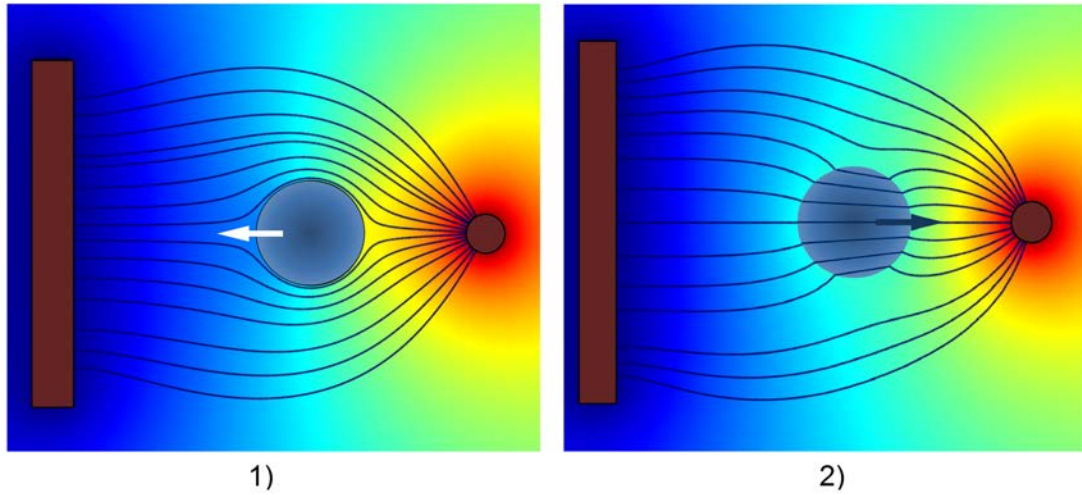


FIGURE 3.6 – Illustration de la diélectrophorèse (1) négative (nDEP) et (2) positive (pDEP).

Plusieurs modèles d'électrodes sont couramment utilisés pour la manipulation des particules. Parmi ces modèles on trouve les électrodes interdigitées [106], les polynomiales [78] et les rectangulaires interdigitées [31]. Schnelle et al. ont proposé un dispositif tridimensionnel permettant le piégeage et l'agrégation des particules dans

une cage de champ [107] [108]. Ce résultat est obtenu en plaçant deux paires d'électrodes quadripolaires l'une au-dessus de l'autre. Cette configuration offre un champ minimum au centre de la cage, ce qui permet une accumulation de particules par diélectrophorèse négative. La figure 3.7 montre le dispositif expérimental ainsi que le piégeage des billes en latex dans la cage de champ. Les électrodes dans le même plan sont excitées avec la même tension alternative $5 V_{rms}$ à 5 MHz, en opposition de phase par rapport aux électrodes du plan opposé.

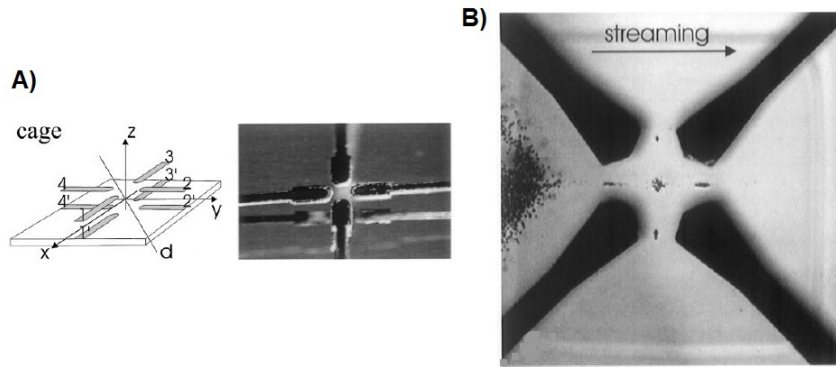


FIGURE 3.7 – A) le dispositif expérimental. B) Billes en latex piégées dans le plan supérieur de la cage [107].

Sur la même problématique, Frénéa et al. ont présenté un microsystème multicouche permettant le placement des particules en amas réguliers par diélectrophorèse négative [109]. Contrairement à celui proposé par Schnelle, ce système offre la possibilité d'avoir un grand nombre de pièges, grâce à la mise en réseau d'électrodes quadripolaires (Figure 3.8). Cependant, la technique de fabrication du microsystème multicouche est une technique laborieuse qui nécessite trois étapes de photolithographie. La première photolithographie consiste à réaliser un réseau de pistes parallèles interdigitées (ce réseau représente les voies d'alimentation). Il s'ensuit une étape d'isolation avec une couche de SiO_2 qui précède la deuxième photolithographie, permettant de définir des ouvertures dans la couche isolante (au-dessus du réseau d'électrodes). Le système est recouvert d'une couche chrome-or avant la dernière photolithographie dédiée à l'obtention des motifs souhaités [110].

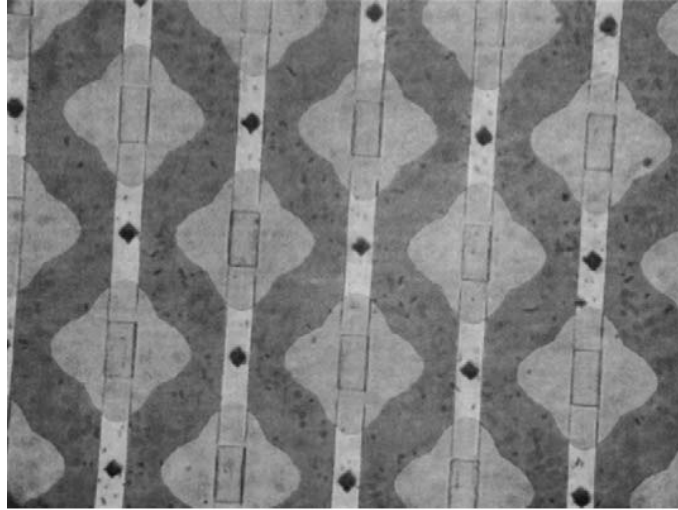


FIGURE 3.8 – Billes de latex de $3\ \mu\text{m}$ piégées par diélectrophorèse négative ($f = 20\ \text{kHz}$, $\sigma_m = 220\ \mu\text{S}/\text{cm}$) [109].

Pour mieux maîtriser la taille et la forme des agrégats, nous avons envisagé de former ces agrégats par une approche "bottom-up", consistant à guider l'assemblage des cellules grâce à l'exploitation du phénomène de diélectrophorèse négative. L'idée est d'utiliser un microsystème composé d'un ensemble d'électrodes quadripolaires, produisant en leur centre un champ électrique minimum [107]. Par diélectrophorèse négative, on peut ainsi piéger et agréger les cellules dans l'espace inter-électrodes. La fabrication du microsystème est basée sur l'exploitation de deux techniques : la gravure sur ITO et le tamponnage du PDMS.

Les électrodes sont fabriquées par gravure d'ITO (Oxyde d'indium-étain)¹ associée à une technique de tamponnage de PDMS (Polydiméthylsiloxane) qui contient du carbone et du silicium. C'est un polysiloxane extrêmement flexible et fortement hydrophobe [111] [112]. Pour la gravure, les lames ITO utilisées sont des lames en verre recouvertes d'une fine couche d'ITO. La technique consiste à enlever une partie de la couche d'ITO à la surface de la lame. Pour cela, il faut protéger les parties que l'on souhaite conserver avec une couche de résine résistant au produit de gravure. La technique de microtamponnage, développée, consiste quant à elle à isoler les électrodes par une fine couche de PDMS et à faire des ouvertures au niveau des motifs. Le but est de passer d'un système d'électrodes bipolaires à un système d'électrodes quadripolaires (Figure 3.9).

1. Il s'agit d'un mélange de 90 % d'oxyde d'indium III (In_2O_3) et de 10 % d'oxyde d'étain IV (SnO_2). Ce composé est incolore et transparent.

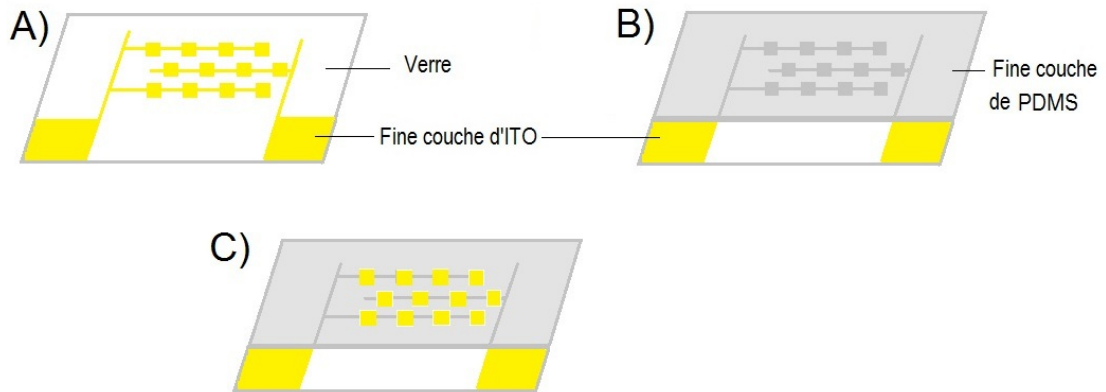


FIGURE 3.9 – Etapes de réalisation d’un système d’électrodes quadripolaires. A) Fabrication d’un système d’électrodes interdigitées par gravure d’ITO. B) Dépôt d’une fine couche de PDMS sur les électrodes interdigitées. C) Création d’ouvertures au niveau des motifs carrés (tamponnage).

3.2.1 Fabrication d’un réseau d’électrodes carrées interdigitées

Le microsystème que l’on souhaite fabriquer se présente sous forme d’un ensemble d’électrodes interdigitées, portant des motifs spécifiques. Les différentes étapes de fabrication peuvent être présentées ainsi :

- La première étape consiste à dessiner les masques sur le logiciel CleWin4. La figure 3.10 présente le masque aux motifs carrés utilisé. La largeur des motifs est de $150\ \mu\text{m}$ et celle des pistes est de $33\ \mu\text{m}$. Ces motifs sont imprimés sur film plastique avec une résolution de 50800 dpi (Selba, Suisse).

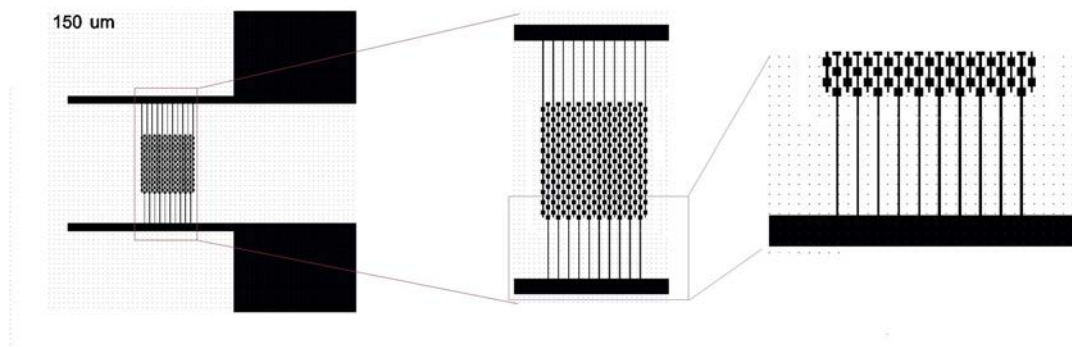


FIGURE 3.10 – Masque dédié à la fabrication des électrodes carrées interdigitées (dessin avec le logiciel CleWin4).

- Une étape de photolithographie est ensuite réalisée à partir des masques ainsi obtenus sur une lame ITO d'épaisseur 120-160 nm et d'une résistance par carré de 8-12 Ω/sq (ohms per square)² (Figure 3.11A)).

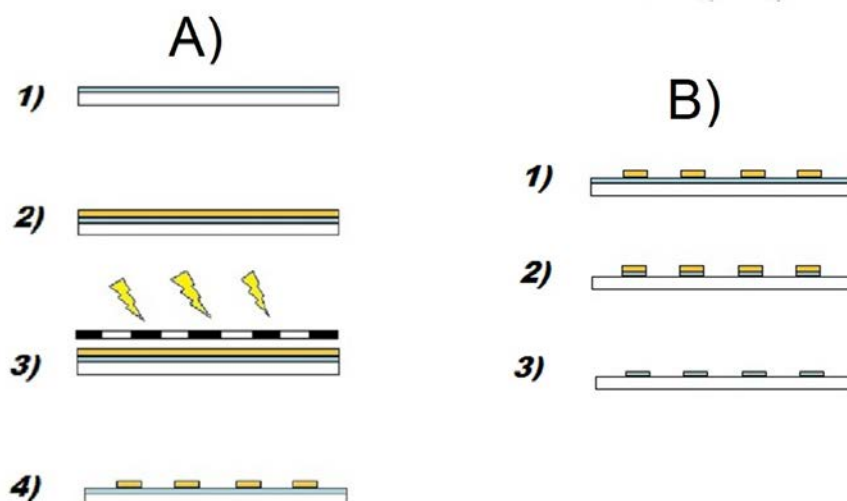


FIGURE 3.11 – A) Etapes de photolithographie. 1) Lame en verre recouverte d'une fine couche d'ITO . 2) Dépôt de résine. 3) Insolation. 4) Développement. B) Gravure d'ITO. 1) Résine SU8 2010 définissant les motifs des électrodes. 2) Gravure de la couche d'ITO non recouverte avec la résine, à l'aide d'une solution $\text{HCL} : \text{HNO}_3$. 3) Enlèvement de la résine à l'aide du Remover PG pour ne garder que les électrodes en ITO.

Plusieurs résines ont été testées (S1813, SU8 2035 et la SU8 2010), les protocoles de photolithographies développés pour les résines utilisées sont présentés en Annexe.

- La dernière étape est celle de la gravure. Elle consiste à plonger ces lames microstructurées dans une solution ($\text{HCL} : \text{HNO}_3$) (4 :1) [100ml=20ml HNO_3 (65%) + 80ml HCL (37%)]. La résine utilisée doit donc résister à cette solution. Parmi celles citées ci-dessus, seule la SU8 résiste, nous avons choisi de travailler avec la SU8 2010 (Chimie Tech Services), du fait que la SU8 2035 est très visqueuse donc difficile à manipuler. La gravure s'effectue sous agitation douce à 65 °C durant 5 min. Il s'ensuit une étape de rinçage à l'eau DI et séchage à l'azote. Pour finir, les lames sont plongées dans le remover PG (Chimie Tech Services) pendant 2 min afin d'enlever la résine et de ne garder que les électrodes en ITO (Figure 3.11B).

La figure 3.12 montre un exemple de résultat de photolithographie sur lame ITO en utilisant la résine SU82010. Sur cette figure on voit le masque de résine obtenu

². La résistance par carré est une mesure de la résistance des couches minces qui ont une épaisseur uniforme. Elle correspond à la résistivité divisée par l'épaisseur de la fine couche

sur l'ITO à l'issue de cette étape.

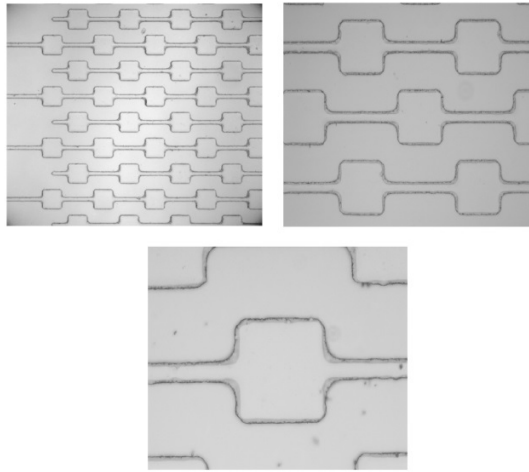


FIGURE 3.12 – Masque de résine formé sur l'ITO à l'issue de l'étape de photolithographie.

La figure 3.13 montre le résultat de la gravure d'ITO avec la solution ($\text{HCL} : \text{HNO}_3$). La partie d'ITO recouverte par la résine SU8 2010 est restée (électrodes en ITO), tandis que le reste a été éliminé.

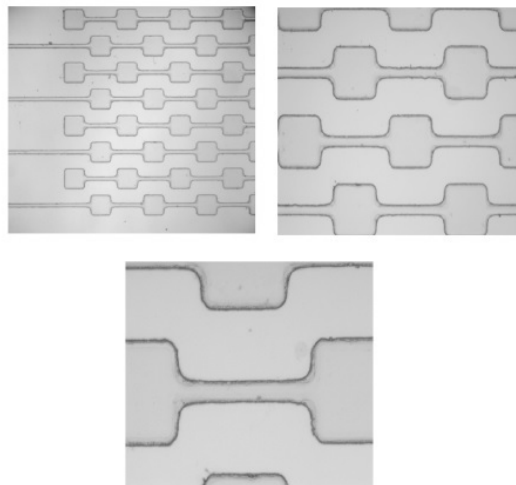


FIGURE 3.13 – Résultat du traitement des lames ITO avec la solution $\text{HCL} : \text{HNO}_3$.

La figure 3.14 montre le résultat final de la gravure. La résine a été éliminée suite à l'utilisation du Remover PG et il ne reste que les électrodes en ITO sur la lame

en verre.

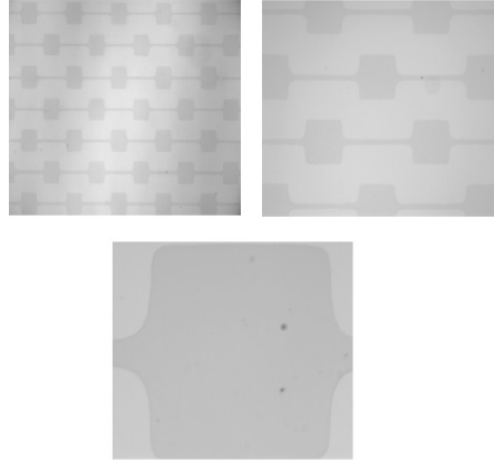


FIGURE 3.14 – Réseau d'électrodes interdigitées obtenu.

3.2.2 Passage à un système d'électrodes quadripolaires

Dans cette partie, nous allons présenter une technique de fabrication d'un système d'électrodes quadripolaires à partir du réseau d'électrodes interdigitées décrit ci-dessus. Ce système d'électrodes quadripolaires permet la formation de plusieurs agrégats simultanément en focalisant les cellules au centre des espaces inter-électrodes sous l'effet de la DEP négative. Le passage d'un système d'électrodes bipolaires à un système d'électrodes quadripolaires est réalisé en couvrant la surface des électrodes par une fine membrane en PDMS, agissant comme isolant électrique. Ensuite, des ouvertures seront effectuées au niveau des électrodes carrées en utilisant la technique de "bond-detach lithography", qu'on appellera aussi tamponnage du PDMS.

Le PDMS

Le PDMS est parmi les polymères les plus utilisés pour la fabrication des dispositifs microfluidiques. Il présente en effet des avantages sur les autres polymères, comme son élasticité (moulage de réplique simple), biocompatibilité, non-toxicité, inflammabilité, transparence optique et faible coût [113] [114]. Parmi ses applications les plus importantes, on trouve la lithographie douce qui concerne la fabrication rapide de microcanaux [115] et l'intégration de composants, tels que les vannes et les pompes dans des dispositifs microfluidiques [116].

Réalisation et dépôt d'une membrane en PDMS

Cette étape consiste à déposer une fine couche de PDMS sur la lame ITO microstructurée préparée selon les explications données dans la partie 3.2.1. Le PDMS utilisé se présente sous forme d'un liquide visqueux (le prépolymère) qu'on mélange à un agent réticulant (durcisseur). Pour la membrane, le mélange (PDMS/Durcisseur) est préparé avec un rapport de masse de (5 :1) (le dégazage de ce mélange est important pour limiter la présence des bulles). Ce mélange est dilué dans de l'heptane pur, le pourcentage du mélange (PDMS/Durcisseur) dans l'heptane pur déterminera l'épaisseur de la fine couche. Le dépôt de ce mélange sur la lame ITO s'effectue à l'aide d'une tournette "spin coater", les paramètres de cette dernière agissent aussi sur l'épaisseur de la fine couche. Le rapport entre l'épaisseur et le ratio PDMS/heptane a été déterminé (Figure 3.15).

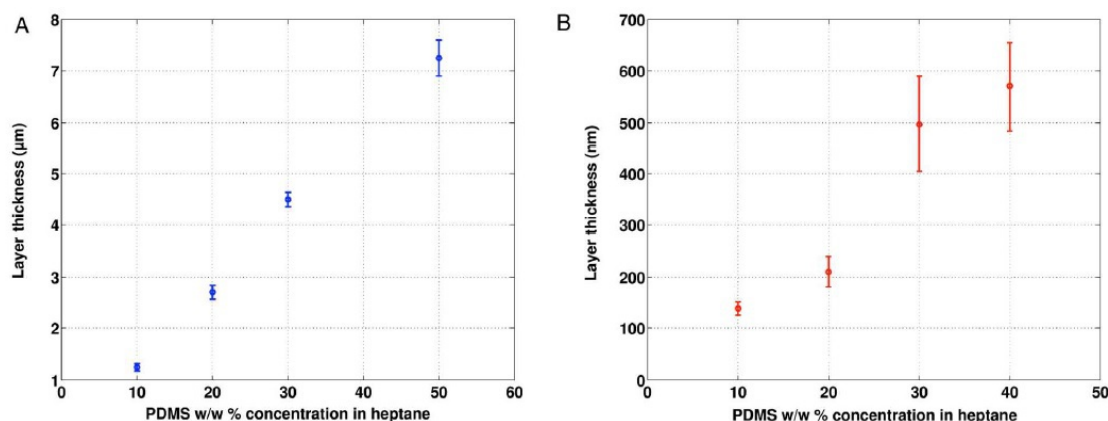


FIGURE 3.15 – Épaisseur de la fine couche en fonction du pourcentage du PDMS dans l'heptane. A) dépôt sur substrat en verre. B) Substrat en verre recouvert d'ITO [117].

La technique de tamponnage donne des résultats meilleurs quand l'épaisseur de la fine couche est faible, d'où notre choix de travailler dans un premier temps à 5 %. Cependant, à ce pourcentage, les électrodes n'étaient pas isolées, il a donc fallu optimiser nos paramètres afin d'avoir une isolation suffisante et de bons résultats de tamponnage. Après quelques tests nous avons conclu qu'une fine couche avec 20 % de (PDMS/Durcisseur) permet de satisfaire aux deux critères cités précédemment. Le mélange contenant 20% de (PDMS/Durcisseur) est déposé sur les lames ITO avec une vitesse de 4500 tr/min pendant 1min.

La figure 3.16 montre une photo d'une lame ITO microstructurée recouverte d'une fine couche du mélange (PDMS/Durcisseur/Heptane). Malgré le dégazage du mélange (PDMS/Durcisseur), on constate parfois la présence de certaines bulles au niveau de la membrane en PDMS. Cependant, ceci n'empêche pas la bonne isolation

des électrodes ITO. Cette lame est placée au four à 80°C durant 2min30, ensuite elle est mise à 4°C afin d'arrêter la polymérisation du mélange PDMS.

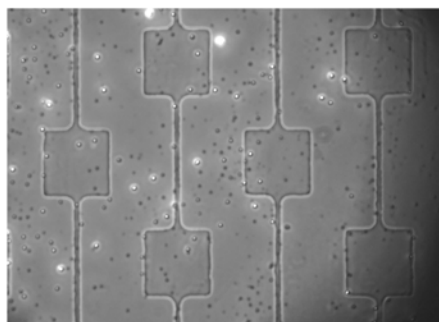


FIGURE 3.16 – Fine couche du mélange (PDMS :Durcisseur :Heptane) déposée sur un réseau d'électrodes interdigitées en ITO sur verre.

Tamponnage du PDMS

Dans cette partie, nous allons nous intéresser au tamponnage du PDMS. Dans la littérature, les techniques de tamponnage du PDMS publiées utilisent généralement la méthode de "blade scratching" [118] ou de "bond-detach lithography" [111].

Le principe du "blade scratching" est décrit sur la figure 3.17-I). La première étape consiste à préparer un substrat avec une couche de résine photosensible microstructurée par photolithographie ((I)1). Ce dernier est recouvert d'une couche de PDMS ((I)2). Ensuite, une lame plate est utilisée pour lisser la surface du substrat ((I)3). Le PDMS est donc localisé dans la région évidée avec quelques résidus sur la surface de la résine ((I)4). Ces résidus sont éliminés par polissage mécanique ((I)5). L'étape finale consiste à mettre le dispositif au four avant d'éliminer la résine avec de l'acétone ((I)6). Le résultat obtenu montre que cette technique a l'inconvénient de produire des membranes avec des cavités importantes au centre.

La technique de "bond-detach lithography"(3.17-II)), quant à elle, consiste à utiliser un substrat recouvert d'une fine couche de PDMS (50-100 nm) ((II)1A) et un tampon en PDMS ((II)4B)(ce tampon est réalisé par moulage sur un substrat microstructuré avec une résine photosensible ((II)1B-2B-3B)). Ces deux parties sont traitées ensuite au plasma ((II)2A-4B), avant de les coller entre elles ((II)5). Après quelques minutes le tampon est décollé du substrat en détachant les surfaces en contact ((II)6-7). Cette méthode demande une maîtrise des processus d'adhésion et de décollage pour éviter toute rupture de la fine couche de PDMS.

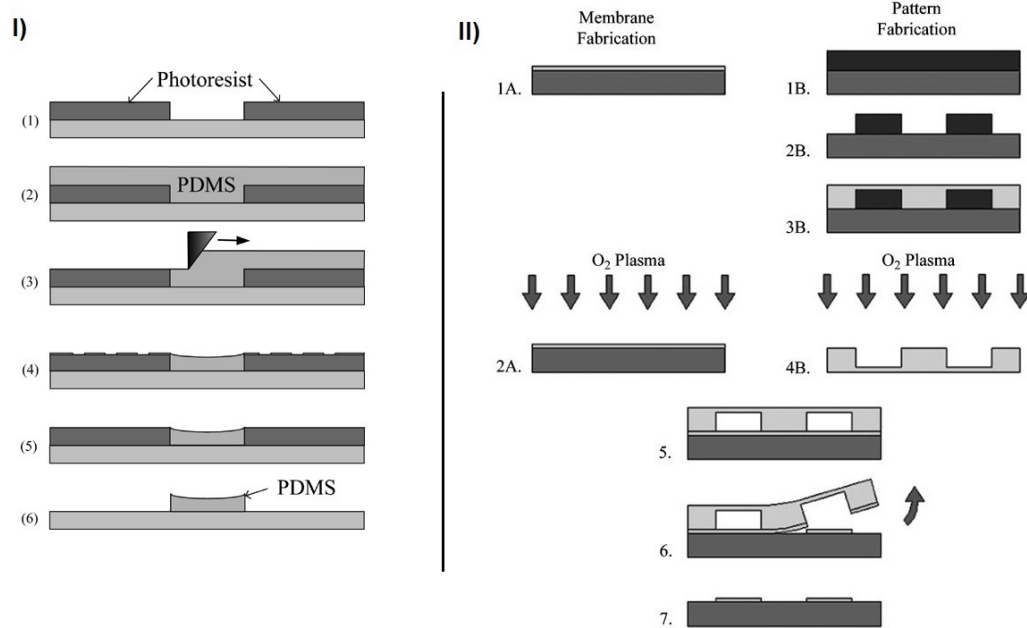


FIGURE 3.17 – Illustration de la technique I) "blade scratching" et II) "bond-detach lithography" [118] [111].

Dans ce qui suit, nous proposons une technique de tamponnage du PDMS basée sur le principe du "bond-detach lithography" avec des simplifications. Ces simplifications ont permis une meilleure maîtrise des étapes d'adhésion et de décollage. En effet, la technique utilisée est identique à celle décrite dans la figure 3.17-II), mais sans l'étape du traitement plasma. Elle se résume donc à isoler la lame d'ITO microstructuée par une fine couche de PDMS, comme décrit dans la partie 3.2.2, pour ensuite faire des ouvertures, à l'aide du tampon en PDMS, au niveau des motifs (Pour faciliter la fusion entre le tampon et la fine couche nous avons utilisé un gradient de réticulant).

Fabrication du tampon en PDMS La préparation du tampon commence par la préparation des moules par photolithographie en utilisant la résine SU8 2035 (comme décrit en annexe). Le masque utilisé est celui présenté dans la figure 3.18. La taille des motifs est identique à celle du masque utilisé pour la gravure des lames ITO, c'est-à-dire $150\ \mu\text{m}$ de côté.

La figure 3.19 montre une partie du moule préparé en utilisant la résine SU8 2035. L'étape suivante consiste à verser un mélange (PDMS :Durcisseur) avec un rapport de masse de (10 :1) (l'utilisation sur ce moule de deux concentrations en agent réticulant différentes entre le mélange PDMS de la fine couche et celui du tampon permet une fusion plus efficace des deux surfaces en contact, favorisant la formation d'ouvertures plus nettes après décollage). L'ensemble est placé au four à

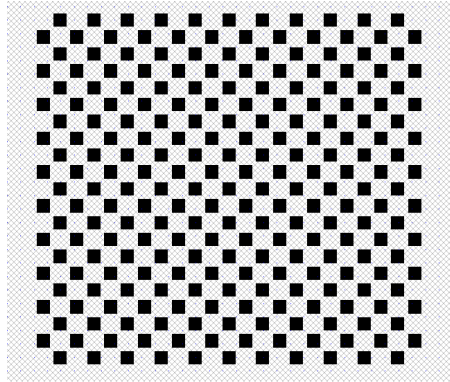


FIGURE 3.18 – Masque dédié à la fabrication des moules pour les tampons en PDMS.

80°C pendant une heure afin d’obtenir une réplique du moule en PDMS polymérisé (le tampon). Pour finir, le tampon est mis à 4°C afin d’arrêter sa polymérisation.

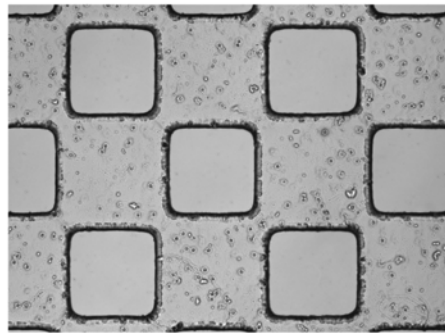


FIGURE 3.19 – Moule obtenu par photolithographie sur la résine SU8 2035 en utilisant le masque présenté dans 3.18.

Résultat du tamponnage

La fine couche de PDMS recouvrant les électrodes ITO et le tampon de PDMS sont ensuite collés par plasma. Le collage se déroule ainsi :

- Alignement des deux parties sous microscope afin de superposer leurs motifs carrés. Une goutte d’éthanol est placée entre les deux parties pour faciliter le déplacement de l’une par rapport à l’autre.
- L’ensemble est ensuite placé au four à 80°C durant 6h minimum. Pendant ce temps, les deux parties de PDMS en contact polymérisent ensemble.
- Pour finir, le tampon est retiré, ce qui permet de former des ouvertures au dessus des motifs carrés des électrodes.

La figure 3.20 montre le résultat final après tamponnage. Elle met en évidence les ouvertures créées au niveau des motifs carrés. Sur cette figure, on constate que

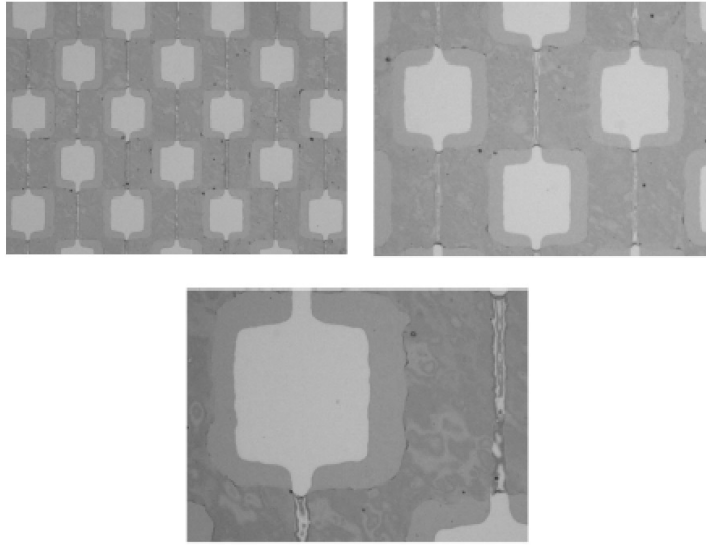


FIGURE 3.20 – Résultat du tamponnage effectué sur une lame d’ITO isolée par une fine couche de PDMS.

les ouvertures sont de taille plus large que les électrodes. Ceci peut être dû à deux phénomènes :

- Réduction de la taille des électrodes lors de la gravure chimique. En effet, à cause des effets de bord, la solution ($HCL : HNO_3$) utilisée pour dissoudre l’ITO non protégé par la résine peut s’infiltrer sous la résine et dissoudre aussi une partie de l’ITO se trouvant dessous.
- Augmentation de la surface de contact entre le tampon et la fine couche en PDMS, probablement en raison du léger affaissement des motifs du tampon lors du processus de collage.

Simulation du champ électrique

Afin de comparer la distribution spatiale du champ électrique dans la configuration des électrodes interdigitées 3.14 (avant le dépôt de la fine couche en PDMS) et dans le cas des électrodes quadripolaires 3.20, des simulations 3D du champ électrique ont été effectuées avec Comsol Multiphysics 4.3b.

Les simulations présentées dans la figure 3.21 montrent que dans le cas des électrodes interdigitées le champ électrique est maximal sur les bords des électrodes et il est minimal dans la zone trapezoïdale située dans l’espace inter-électrodes. Tandis que dans le cas des électrodes quadripolaires obtenues après tamponnage de la fine couche en PDMS, le champ électrique reste maximal sur les bords des électrodes et devient minimal au centre des électrodes quadripolaires. Dans la deuxième configuration, les cellules pourront donc être focalisées par diélectrophorèse négative vers ce point central.

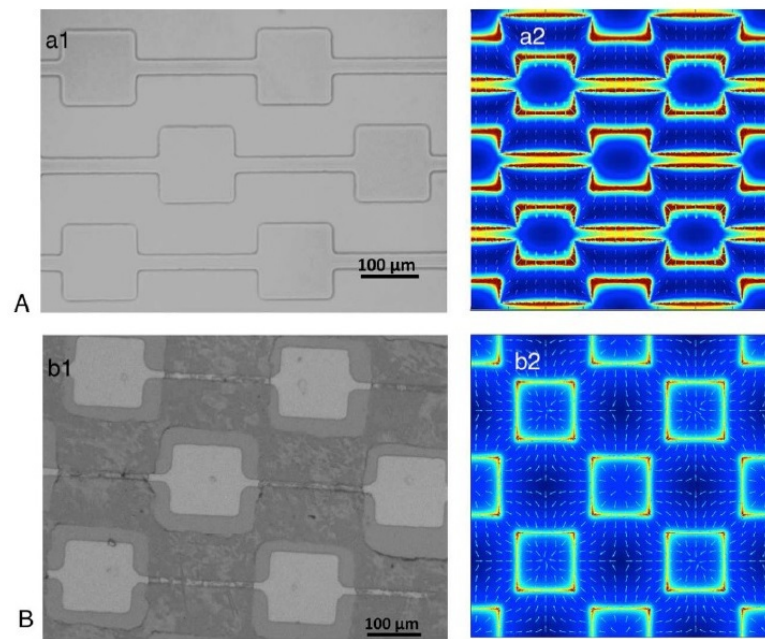


FIGURE 3.21 – Comparaison de la distribution du champ électrique avec et sans la fine couche. A)a1) Electrodes interdigitées en ITO. A)b1) Simulation du champ électrique dans le plan horizontal à $1.5 \mu\text{m}$ des électrodes ($|E|_{\text{max}}=1.6 \cdot 10^5 \text{ V/m}$, $V=10 \text{ V}_{pp}$). B)a1) Electrodes quadripolaires après tamponnage de la fine couche en PDMS. B)b1) Simulation du champ électrique en présence de la fine couche de PDMS.

3.2.3 Validation du microsystème utilisé

Préparation de l'échantillon et dispositif expérimental

Pour cette expérience, les cellules HEK 293 sont cultivées comme décrit au chapitre II. Elles sont ensuite resuspendues dans une solution tampon dont les propriétés sont ajustées pour contrôler le comportement diélectrophorétique des cellules et préserver leur viabilité. Les paramètres les plus importants à prendre en compte sont :

- La conductivité qui doit être faible par rapport au milieu de culture des cellules afin de limiter les risques d'échauffement.
- Le pH et l'osmolarité qui doivent être réglés pour assurer le maintien des fonctions biologiques des cellules. Pour la majorité des cellules le pH est d'environ 7.4 et l'osmolarité doit être comprise entre 280 et 300 mOsm/l.

La solution tampon utilisée est composée d'eau dé-ionisée avec 5 % de dextrose et présente les caractéristiques suivantes :

- Osmolarité : 287 mOsm/l
- pH : 7.4

La conductivité électrique sera ensuite ajustée en rajoutant du PBS. Les cellules en suspension (avec une concentration importante $3 \cdot 10^5$ cellule/ml) dans la solution tampon, sont déposées à l'intérieur d'une chambre délimitée par un joint collé sur le microsystème. Une lame est placée sur le joint pour éviter les mouvements de fluide pouvant engendrer des phénomènes perturbateurs et l'évaporation de la solution, entraînant une hausse de conductivité. Les électrodes du microsystème sont par la suite connectées à un générateur délivrant une tension sinusoïdale (générateur Agilent 33250A) de 10V crête à crête, à une fréquence de 10 kHz. Le choix de cette fréquence est basé sur les expériences présentées au chapitre 2 qui ont montré qu'à 10 kHz les cellules HEK 293 sont soumises à la diélectrophorèse négative. La figure 3.22 représente le tracé de l'évolution de la partie réelle du facteur de clausius-Mossotti en fonction de la fréquence pour différentes conductivités du milieu. Ce tracé a été effectué en utilisant les paramètres électriques des cellules HEK déterminées au chapitre II, et montre qu'à 10 kHz $\text{Re}[K(\omega)]$ est négative. Les cellules devraient donc bien être soumises à la diélectrophorèse négative. L'expérience sera effectuée dans un milieu de conductivité 50 mS/m. Cette valeur est assez importante pour avoir la valeur maximale du $\text{Re}[K(\omega)]$ (-0.5) à 10 kHz et assez faible pour éviter les échauffements par effet Joule. Nous ne souhaitons pas travailler en dessous de 10 kHz pour éviter des effets non souhaités tels qu'électrolyse ou électroosmose. La figure 3.23 montre le dispositif expérimental utilisé, placé sous microscope pour l'observation du comportement des cellules.

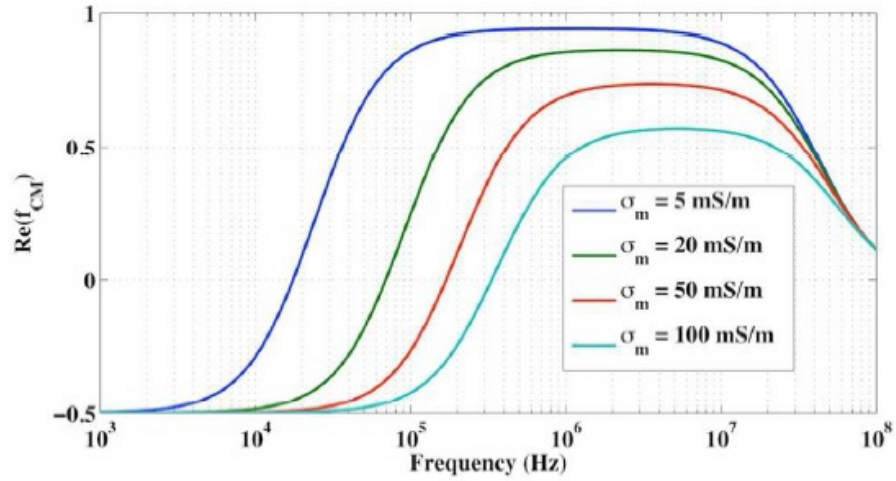


FIGURE 3.22 – Partie réelle du facteur de claussius-Mossoti en fonction de la fréquence et de la conductivité de la solution tampon pour une cellule HEK 293 de $15 \mu\text{m}$ de diamètre [117].

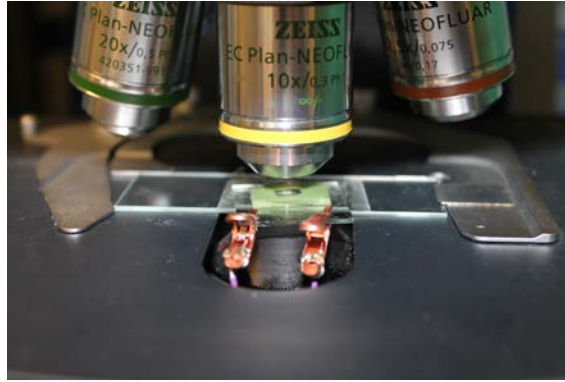


FIGURE 3.23 – Dispositif expérimental utilisé pour la création des agrégats de cellules HEK 293 par diélectrophorèse négative.

Résultat obtenu avec les cellules HEK 293

Cette partie présente le premier résultat obtenu concernant la formation des agrégats de cellules HEK par diélectrophorèse négative sous 10V crête à crête, à une fréquence de 10 kHz et avec un milieu de suspension de conductivité 50 mS/m. La figure 3.24 met en évidence la formation d'agrégats réguliers au centre des ensembles d'électrodes quadripolaires. Ces agrégats font à peu près la même taille et ont tendance à former des parallépipèdes de $150 \mu\text{m}$ de côté et de hauteur $50 \mu\text{m}$ (estimée à l'aide du module z-stack du logiciel AxioVision).

Durant cette expérience, la formation des agrégats était rapide. En effet, quelques secondes après la mise sous tension des électrodes, les cellules se dirigent vers le centre de l'espace interélectrodes et commencent à former les agrégats. En l'espace de quelques minutes les agrégats prennent la forme parallélépipédique observable sur la figure.

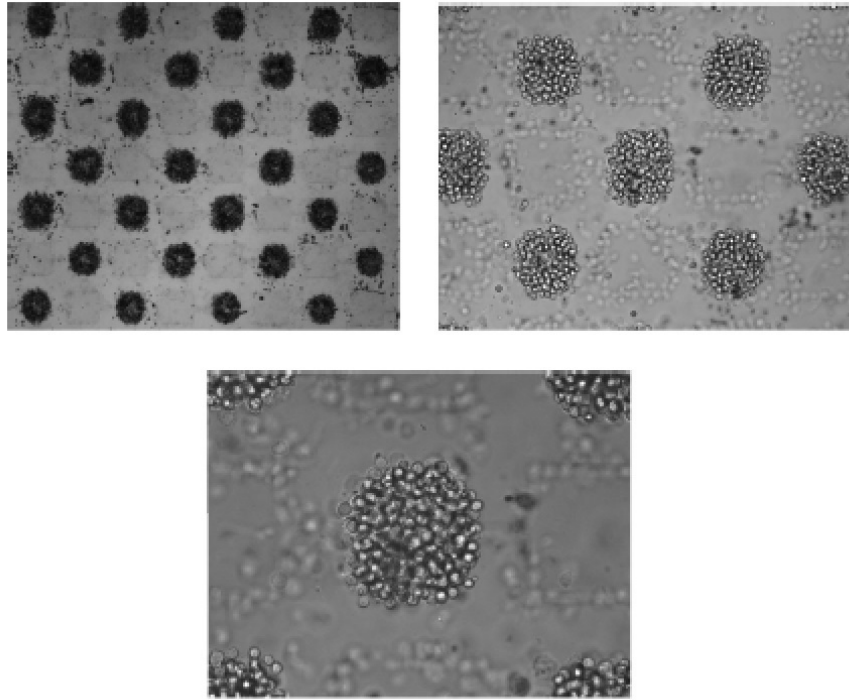


FIGURE 3.24 – Formation d'agrégats de cellules HEK 293 entre les électrodes carrées ($f = 10\text{kHz}$, $\sigma = 50\text{ mS/m}$).

Les agrégats obtenus ne sont pas permanents. En coupant le champ électrique, les cellules commencent à se détacher petit à petit de l'agrégat. Cependant, d'autres expériences effectuées ultérieurement au sein de notre équipe par Samia Menad, ont permis d'obtenir des agrégats permanents en jouant sur le temps d'exposition au champ électrique. Au bout de 15 minutes sous 10V crête à crête à une fréquence de 10 kHz les agrégats commencent à tenir. La figure 3.25 montre les agrégats de cellules HEK après coupure du champ électrique et remplacement du milieu de suspension par le milieu de culture de cellules. Ce résultat est prometteur et permet de valider notre approche qui consiste à combiner la diélectrophorèse négative à un microsystème relativement simple et économique, basé sur le tamponnage d'une fine couche de PDMS déposée sur des électrodes en ITO.

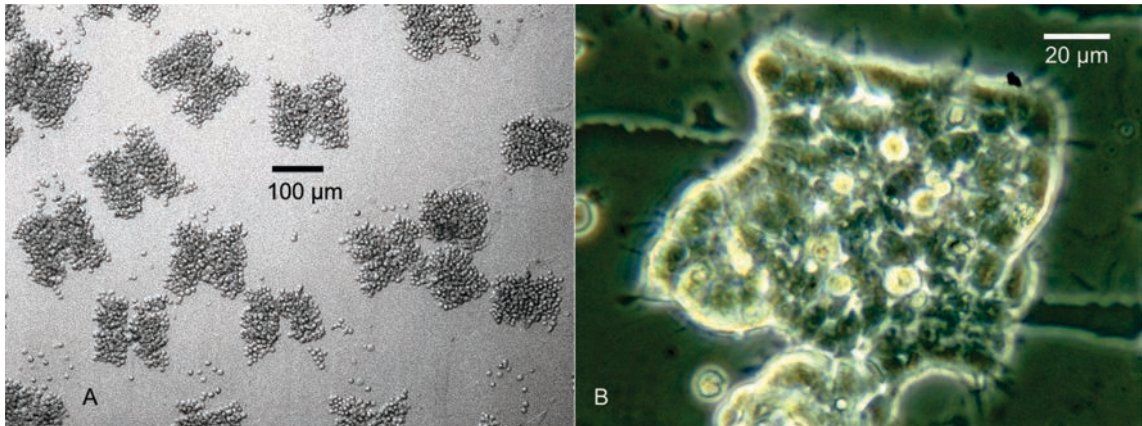


FIGURE 3.25 – A) Agrégats de cellules HEK après coupure du champ électrique. B) Après récupération et incubation une nuit dans du milieu de culture.

3.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté deux techniques permettant la formation des agrégats de cellules HEK 293. La première est basée sur la nature des jonctions cellulaires. Plus précisément, nous avons essayé d'exploiter la dépendance au calcium des jonctions adhérentes qui peuvent lier les cellules entre elles. Cela a permis une création d'agrégats permanents de forme plus ou moins homogène. La deuxième technique utilise la manipulation des cellules sous l'effet d'un champ électrique non uniforme. Les résultats obtenus par cette technique sont meilleurs. En effet, le microsystème développé pour cette technique a permis la création d'une cartographie de champ adapté à la formation d'un ensemble d'agrégats de cellules de taille et de forme précises. Dans un premier temps, les agrégats obtenus n'étaient pas permanents. Sous l'effet de la diélectrophorèse positive, ils se dissocient et les cellules migrent vers les bords des électrodes (maximum du champ). Cependant, d'autres expériences ont montré la possibilité d'obtenir des agrégats permanents en jouant sur la durée d'exposition au champ électrique. Cela a permis de valider notre approche visant à créer des agrégats de cellules HEK par diélectrophorèse négative. Dans le chapitre suivant, l'objectif sera de prédire le comportement électrique des agrégats de cellules biologiques HEK. Plus précisément, nous allons essayer de comprendre le lien entre le comportement électrique des agrégats de cellules et celui d'une cellule isolée. Cela sera effectué en nous basant sur des simulations de spectres d'électrorotation.

Appendices

Annexe A

Protocoles de photolithographie développés pour les résines S1813, SU8 2035 et la SU8 2010.

S1813 : Résine photosensible positive (ce qui est insolé se dissout au développement) de viscosité moyenne.

1. Nettoyage des lames au plasma à air (Plasma cleaner, HARRICK PLASMA)¹ pendant 2 min et 30 s.
2. Dépôt de résine sur la lame à 4000 tr/min pendant 30 s, ce qui donne une épaisseur d'environ 1.3 μm .
3. Recuit à 105 °C durant 4 min.
4. Exposition durant 11 s à 52% (12.74 mW/cm²) en utilisant le UV-KUB de chez Kloeé .
5. Développement durant 1 min avec un mélange (S351 :eau) (1 :5 ou 1 :10).
6. Recuit à 105 °C durant 4 min.

SU8 2035 : Résine photosensible négative (ce qui n'est pas insolé se dissout au développement) de viscosité très importante.

1. Nettoyage des lames au plasma à air pendant 2 min et 30 s.
2. Dépôt de résine sur la lame à 500 tr/min pendant 10 s, ensuite à 4000 tr/min pendant 30 s (c'est une résine délicate à utiliser qui se nettoie à l'acétone).
3. Recuit 2 min à 65 °C ensuite 7 min à 95 °C.
4. Exposition durant 10 s à 100% (24 mW/cm²).
5. Recuit 1 min à 65 °C ensuite 6 min à 95 °C.

1. C'est un procédé de nettoyage chimique, sec et sans contact, qui offre un nettoyage de très haute qualité.

6. Développement avec du PGMEA (Propylene Glycol Methyl Ether Acetate) en agitant 1 min de chaque côté, suivi d'un lavage à l'isopropanol.
7. Recuit à 120 °C durant 6 min.

SU8 2010 : Résine photosensible négative (ce qui est insolé ne se dissout pas au développement) de viscosité importante.

1. Nettoyage des lames au plasma à air pendant 2 min et 30 s.
2. Recuit de 10 min à 95 °C (on laisse bien refroidir la lame avant l'étape suivante).
3. Dépôt de résine sur la lame à 500 tr/min pendant 8 s, ensuite à 3000 tr/min pendant 60 s.
4. Recuit 1 min à 65 °C, ensuite 2 min à 95 °C et pour finir 1 min à 65 °C.
5. Exposition durant 10 s à 100% (24 mW/cm²).
6. Recuit 1 min à 65 °C, ensuite 2 min 30 à 95 °C et pour finir 1 min à 65 °C.
7. Développement en agitant doucement la lame dans du PGMEA durant 40 s suivi d'un lavage à l'isopropanol.
8. Recuit à 120 °C durant 6 min.

Pour établir ces protocoles, nous nous sommes inspirés des fiches techniques données par les fabricants des résines en leur apportant des modifications. Ces modifications étaient nécessaires pour obtenir le résultat souhaité.

Chapitre 4

Expériences numériques avec des agrégats de cellules

Dans le chapitre II, des cellules HEK ont été caractérisées électriquement puis deux techniques ont été proposées dans le chapitre III pour former des agrégats de cellules. Naturellement, l'étape suivante consistait à caractériser les agrégats de cellules HEK mais les expériences n'ont pas pu être réalisées, faute de temps. Nous nous sommes donc limités à faire des simulations numériques. Cependant, les expériences numériques ont été choisies pour apporter un éclairage sur le lien qui existe entre les propriétés électriques à l'échelle de la cellule et à l'échelle du tissu.

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord étudié les propriétés électriques attendues pour un agrégat de cellules HEK 293 à partir des données disponibles dans la littérature pour le rein, dont sont issues les cellules HEK. Puis des expériences numériques ont été effectuées en introduisant dans la modélisation des hypothèses sur la structure de l'agrégat afin de rendre compte du comportement électrique attendu.

4.1 Comportement électrique attendu d'un agrégat de cellules HEK

4.1.1 Propriétés électriques des cellules HEK 293 et du rein

Les cellules HEK 293 sont précisément issues du tissu épithélial de rein d'embryon humain. Dans la littérature, on ne dispose pas précisément de caractéristiques électriques sur les embryons humains. Par contre, beaucoup de travaux ont été effectués sur les tissus du corps humain ; il existe une application en libre accès sur le web qui fournit les propriétés électriques d'un grand nombre de tissus pour différentes fréquences [119]. La figure 4.1. montre la permittivité relative et la conductivité données dans le cas du rein sur la bande de fréquences $10kHz - 100MHz$.

L'allure du spectre attendu pour un tissu est donnée dans le chapitre I figure (1.9) ; on y distingue notamment trois dispersions α , β et γ . On s'intéressera ici

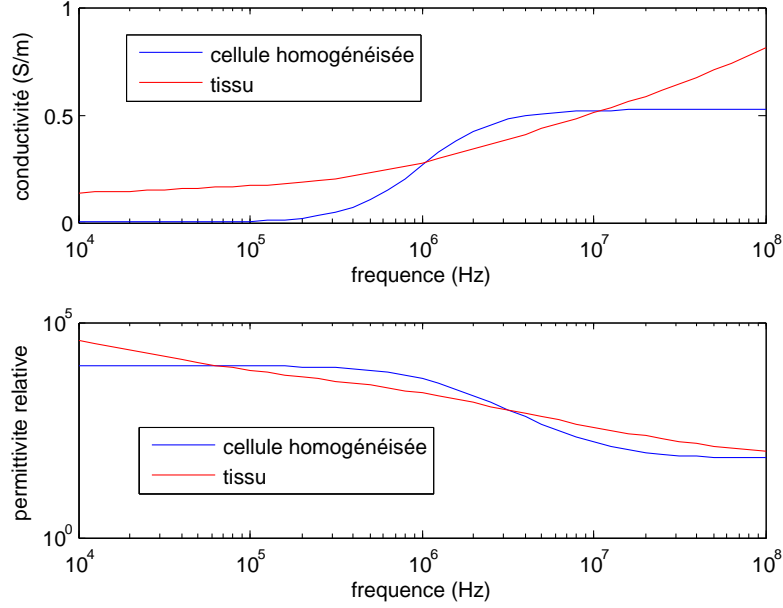


FIGURE 4.1 – Comparaison des propriétés électriques du rein et d’une cellule HEK 293 homogénéisée

uniquement à la dispersion β qui est priori contenue dans la bande de fréquences $10kHz - 100MHz$. Cette dispersion est liée aux effets dits de Maxwell Wagner qui apparaissent à l’interface de deux milieux diélectriques [120]. L’examen des courbes de la figure 4.1 pour le cas du rein ne fait pas apparaître de palier comme le suggérerait la figure (1.9) du chapitre I. L’une des explications généralement avancées est qu’un tissu biologique est loin d’être un matériau idéal dans le sens où les cellules présentent des caractéristiques différentes ; en particulier des cellules de tailles différentes conduisent à une distribution en fréquence de la dispersion β .

Sur cette même figure, les propriétés homogénéisées d’une cellule HEK isolée sont également représentées : elles sont calculées à partir de l’expression de la permittivité complexe effective de la cellule ϵ_p^* introduite dans le chapitre I. Le calcul nécessite de connaître les propriétés électriques du cytoplasme et de la membrane. Les valeurs retenues ici sont celles fournies dans le chapitre II (Table 2.1). Sur la figure 4.1, on constate que les ordres de grandeur entre le tissu et la cellule homogénéisée sont les mêmes que ce soit pour la conductivité ou la permittivité relative. Par contre, les allures sont différentes, les courbes dans le cas de la cellule homogénéisée faisant apparaître le palier attendu dans le cas de la dispersion β .

Cependant, la permittivité complexe effective ϵ_p^* de la cellule ne définit une permittivité équivalente que dans une certaine limite : en présence d’un champ électrique extérieur uniforme, le champ électrique induit par une sphère placée dans le vide et constituée uniquement du matériau de permittivité ϵ_p^* est le même que celui induit

par la sphère de même rayon qui serait constituée de deux matériaux pour décrire le cytoplasme et la membrane. ϵ_p^* contient donc notamment les effets de la polarisation induite à l'interface entre la membrane et le cytoplasme, ce qui explique pourquoi on observe une dispersion β . Par contre, le milieu extracellulaire n'est pas pris en compte. On observe par exemple sur la figure 4.1 que la conductivité équivalente de la cellule est nulle dans le domaine des basses fréquences car la membrane est isolante ; pour autant la conductivité du tissu n'est pas nulle car les courants de conduction peuvent a priori circuler dans le milieu extracellulaire. D'autre part, les effets de polarisation à l'interface entre la membrane et le milieu extracellulaire ne sont pas décrits, ce qui a priori modifierait aussi la dispersion β .

Ainsi, les différences observées sur les propriétés électriques entre le tissu et la cellule tiennent a priori à deux raisons. D'une part, le milieu extracellulaire joue un rôle dans la bande de fréquences associée à la dispersion β . De manière plus générale, on peut avancer que la structure du tissu et notamment les jonctions cellulaires peuvent influencer. D'autre part, les cellules étant de taille variable, cette dispersion n'est pas vraiment marquée : on n'observe pas de palier dans le spectre des propriétés électriques du tissu. Dans ce qui suit, on propose de modéliser le comportement électrique d'agrégats de cellules afin d'évaluer quantitativement la pertinence de ces deux explications. La question qui se pose alors est de savoir comment on peut caractériser les propriétés électriques d'un agrégat.

4.1.2 Peut-on caractériser un agrégat par électrorotation ?

Pour caractériser un tissu biologique, on utilise généralement la spectroscopie d'impédance comme cela a été évoqué dans le chapitre 1. Cependant, on s'interroge ici sur l'opportunité d'utiliser l'électrorotation. L'intérêt réside dans le fait que nous maîtrisons cette technique comme le montre le chapitre 2 où des cellules isolées ont été caractérisées. La perspective de caractériser expérimentalement un agrégat composé d'une dizaine voire d'une centaine de cellules nécessiterait tout au plus le redimensionnement d'un microsysteme où la zone interélectrodes serait ajustée pour pouvoir manipuler des agrégats.

D'un point de vue théorique, l'électrorotation est une manière de caractériser une particule, une cellule ou un amas de cellules par le biais du dipôle électrique induit. La formule (1.8) dans le chapitre I montre que le spectre d'électrorotation théorique (et donc le dipôle électrique induit) dépend du facteur de Clausius Mossotti (plus précisément de la partie imaginaire). Dans le cas d'une cellule isolée, le facteur de Clausius Mossotti $K(\omega)$ est fonction de la permittivité complexe effective de la cellule ϵ_p^* et du milieu ϵ_m^* où baigne la cellule :

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (4.1)$$

On peut extrapoler que, dans le cas d'un agrégat de cellules, le facteur de Clausius Mossotti dépendra de la permittivité complexe effective de l'agrégat : il contiendra donc les effets à l'interface du cytoplasme et de la membrane comme pour une cellule isolée mais aussi les effets à l'interface de la membrane et du milieu extracellulaire car l'agrégat englobe les cellules et le milieu extracellulaire. L'électrorotation apparaît donc comme un moyen expérimental pour caractériser indirectement les propriétés électriques d'un agrégat de cellules.

Une expérience numérique consiste à calculer le spectre d'électrorotation dans le cas où les propriétés de l'agrégat sont celles du tissu. Concrètement, on considère une sphère constituée d'un matériau dont la conductivité et la permittivité sont celles du rein données figure 4.1, autrement dit dont la permittivité complexe est donnée par $\epsilon_{tissu}^* = \epsilon_{tissu} - j\sigma_{tissu}/\omega$. Dans ces conditions, le facteur de Clausius Mossotti s'exprime de la façon suivante :

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_{tissu}^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_{tissu}^* + 2\epsilon_m^*} \quad (4.2)$$

La figure 4.2 donne la partie imaginaire du facteur de Clausius Mossotti (soit à un facteur près le spectre d'électrotation) dans le cas du tissu et d'une cellule isolée.

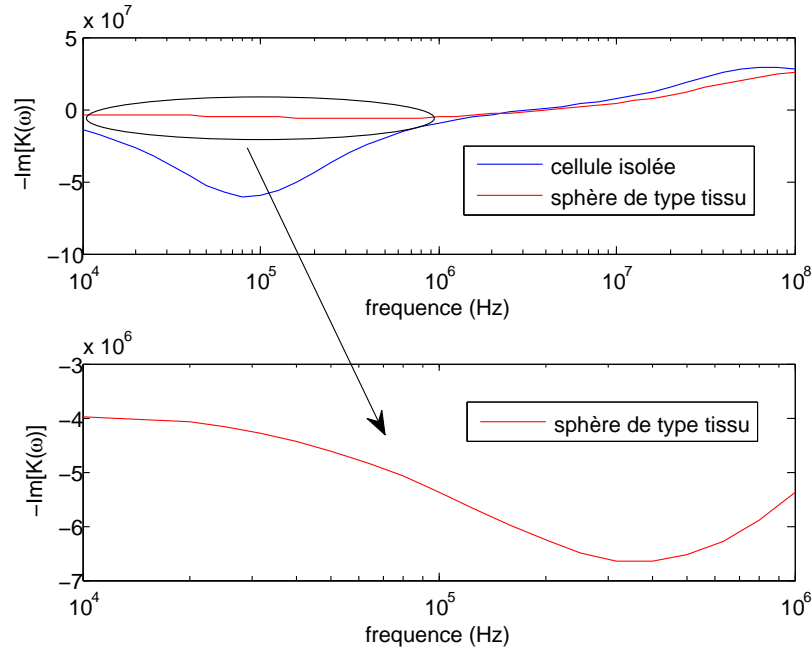


FIGURE 4.2 – Partie imaginaire du facteur de Clausius Mossotti d'une cellule HEK et d'une sphère ayant les propriétés du rein.

On observe que la résonance dite anti-field est beaucoup moins marquée dans le cas du tissu et un peu décalée vers les hautes fréquences. Cette première résonance apparaît pour des fréquences inférieures à 1 MHz . Dans ces conditions, on sait que le champ électrique ne traverse pas la membrane : seuls la membrane et le milieu extracellulaire sont donc polarisés, ce qui explique l'écart entre la cellule et le tissu. La deuxième résonance dite co-field est modifiée mais de manière moins marquée que la première. Cette seconde résonance apparaît pour des fréquences supérieures à 10 MHz . Dans ces conditions, on sait que le champ électrique traverse la membrane : le cytoplasme est donc polarisé et joue un rôle prépondérant, ce qui explique le peu de différences entre la cellule et le tissu.

Dans ce qui suit, nous proposons d'utiliser le spectre d'électrorotation d'un agrégat de petite taille pour caractériser ses propriétés électriques. D'un point de vue expérimental, cela demande le développement d'un nouveau microsystème constitué d'électrodes épaisses afin de limiter les effets 3D qui tendent à déformer les lignes de champ. Comme décrit au chapitre 1, l'intégration d'électrodes métalliques épaisses dans un dispositif microfluidique étanche peut s'avérer délicate. Pour contourner ce problème, il est possible de recourir à l'emploi de PDMS dopé au carbone (cPDMS), matériau nanocomposite pouvant être structuré grâce aux techniques de lithographie douce [121] [122]. Le processus de préparation du cPDMS et de fabrication du dispositif microfluidique seront décrits en annexe. N'ayant pas eu le temps de tester le nouveau dispositif d'électrorotation, nous avons réalisé des expériences numériques sur des agrégats comportant un petit nombre de cellules. Les résultats de ces simulations sont présentés dans la suite du chapitre.

4.2 Modélisation d'un agrégat de cellules HEK

4.2.1 Modélisation par éléments finis du microsystème

Par souci de simplification, le modèle est construit en deux dimensions (voir figure 4.3). Le microsystème est constitué de quatre électrodes dont la forme polynomiale a été discutée dans le chapitre 2. La distance entre les électrodes est fixée à $d_{elec} = 400\text{ }\mu\text{m}$ afin de pouvoir placer un agrégat de plusieurs cellules tout en garantissant l'uniformité du champ électrique généré par les quatre électrodes (la zone uniforme mesure $200\text{ }\mu\text{m}$ environ (Chapitre 2 (Figure 2.3))).

On cherche à calculer le spectre d'électrorotation d'une cellule ou d'un agrégat placé au centre de la zone inter électrodes. Plus exactement, on calcule ici le couple moyen que subit la cellule ou l'agrégat. En effet, les équations [(1.5)-(1.8)] du chapitre I montre que cette quantité est proportionnelle à la vitesse de rotation au signe près. Concrètement, le couple moyen Γ est calculé en appliquant le tenseur de Maxwell [123] : on définit un cercle fictif C qui englobe la cellule ou l'agrégat puis on calcule

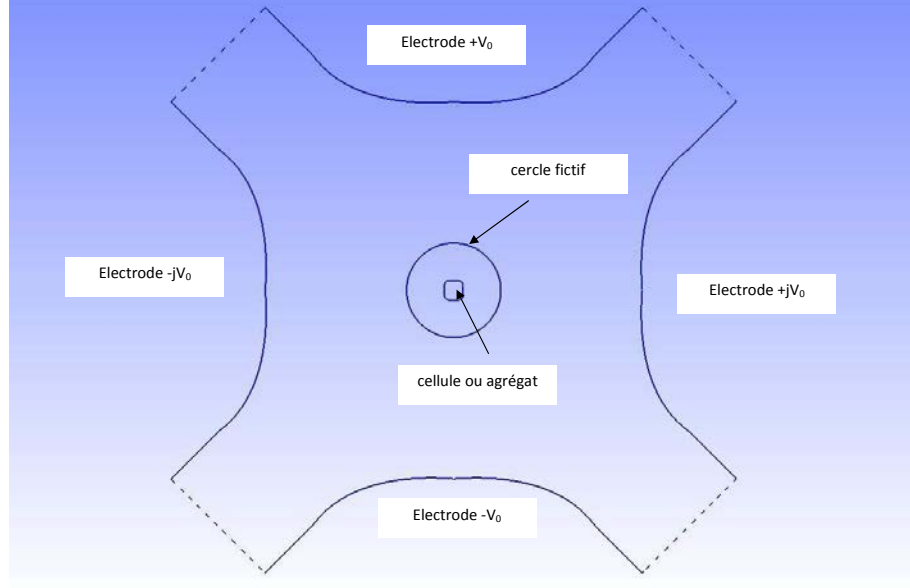


FIGURE 4.3 – Géométrie du microsystème en deux dimensions

l'intégrale suivante :

$$\Gamma = \frac{\epsilon_b}{2} \oint_C n_x n_y (E_y^2 - E_x^2) + (n_x^2 - n_y^2) E_x E_y dl \quad (4.3)$$

où n_x, n_y sont les composantes du vecteur normal au cercle C et E_x, E_y les composantes du champ électrique total \mathbf{E} .

Pour obtenir le champ électrique $\mathbf{E}(x, y)$, on résout un problème électrique quasi statique en régime harmonique. Dans ces conditions, l'inconnue du problème est le potentiel électrique $V(x, y)$ défini de sorte que $\mathbf{E} = -grad(V)$ et solution du problème :

$$div[(\sigma + j\omega\epsilon)grad(V)] = 0 \quad (4.4)$$

où σ et ϵ définissent la conductivité et la permittivité d'une région (cytoplasme, milieu extracellulaire ou bain). Le cas de la membrane est traité différemment.

En effet, la membrane est d'épaisseur faible (quelques nanomètres) comparée à la taille des cellules et des électrodes (quelques dizaines de micromètres). Le problème numérique est résolu par la méthode des éléments finis, ce qui nécessite de mailler le domaine. En raison de problèmes d'ordre numérique, il faut éviter de mailler la membrane. Une solution est de décrire une région sans épaisseur sur la frontière qui borde le domaine associé au cytoplasme [124]. Les propriétés de la membrane ne sont alors pas modélisées par une conductivité et une permittivité mais par une admittance Y_m :

$$Y_m = G_m + j\omega C_m \quad (4.5)$$

où la conductance G_m et la capacité C_m de la membrane, définies dans le chapitre I équation (1.4), sont deux grandeurs qui font intervenir l'épaisseur de la membrane.

Concernant les conditions aux limites du domaine, des conditions de Dirichlet $V = \{V_0, jV_0, -V_0, -jV_0\}$ sont imposées sur la frontière associée aux quatre électrodes et des conditions de Neumann entre les électrodes sur les lignes en pointillé (voir figure 4.3).

Le programme éléments finis a été réalisé en utilisant le logiciel *gmsh* pour le maillage et la librairie *getfem* pour la construction du problème numérique. Afin de valider le code, une simulation a été effectuée pour une cellule HEK de rayon $r = 10 \mu m$ avec les propriétés électriques données dans le chapitre II (Table 2.1). La cellule baigne dans un milieu de conductivité $50 mS/m$ et de permittivité relative 80. Le couple théorique n'est pas celui donné dans le chapitre 2 car le problème est décrit en deux dimensions. Dans ce cas, le facteur de Clausius Mossotti $K_{2D}(\omega)$ (les détails du calcul sont rapportés dans l'annexe) est donné par :

$$K_{2D} = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p + \epsilon_m^*} \quad (4.6)$$

où la permittivité effective de la cellule ϵ_p^* reste inchangée. Ce résultat peut paraître surprenant. En effet, la permittivité effective d'une structure constituée de deux couches de matériaux est de manière générale différente dans les cas cylindrique et sphérique. Mais dans la situation particulière où la deuxième couche est très petite devant la première et moyennant quelques approximations, on obtient les mêmes expressions.

Le couple en deux dimensions (des précisions sur le calcul sont rapportées dans l'annexe) est donné par :

$$\vec{\Gamma}_{2D}(\omega) = -2\pi\epsilon_m r^2 \text{Im}[K_{2D}(\omega)] E_0^2 \vec{k} \quad (4.7)$$

Pour évaluer le champ électrique E_0 créé par les électrodes quadripolaires en l'absence de cellule, une simulation numérique a été réalisée. Dans cette simulation, il n'y a aucune cellule dans la zone inter-électrodes et on n'alimente que deux des quatre électrodes : le potentiel est maintenu à $+V_0$ et $-V_0$ sur les deux électrodes en haut et en bas de la figure 4.3 tandis qu'il est fixé à zéro sur les deux autres. On extrait ensuite la valeur du champ électrique au centre de la zone inter-électrodes ; le résultat obtenu peut s'écrire sous la forme suivante :

$$E_0 = 0.81 \frac{2V_0}{d_{elec}} \quad (4.8)$$

Le coefficient 0.81 traduit le fait que le champ électrique obtenu est plus faible que dans le cas où le dispositif aurait été constitué d'une paire d'électrodes planes placées parallèlement l'une de l'autre. La diminution de l'amplitude du champ est due à la forme des électrodes polynomiales mais aussi et surtout à la présence des deux autres électrodes indispensables dans un dispositif dédié à l'électrorotation. La valeur de 0.81 est cohérente avec les résultats obtenus dans la littérature [125]

A partir des équations (4.6), (4.7) et (4.8), on peut calculer le couple attendu théoriquement. Par ailleurs, la simulation par éléments finis a été effectuée avec un maillage ayant conduit à résoudre un problème avec 1871 inconnues. La figure 4.4 montre les résultats obtenus.

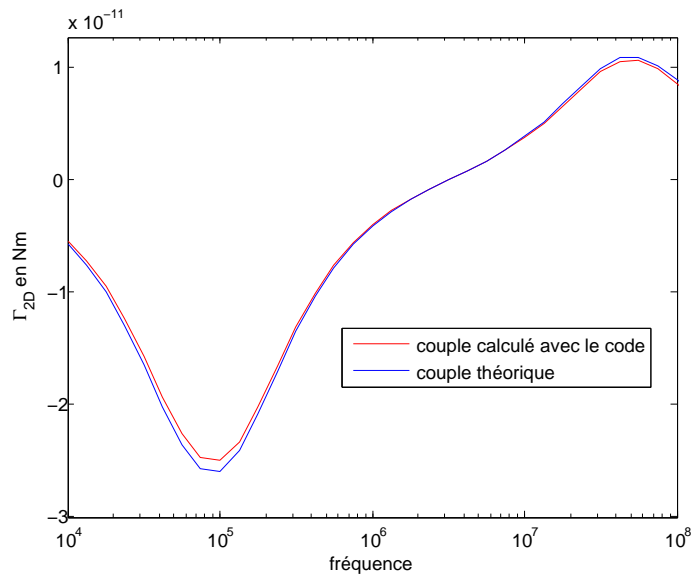


FIGURE 4.4 – Couple théorique et couple calculé par le code éléments finis dans le cas d'une cellule ronde

On constate que le couple calculé par le code est très proche de celui attendu théoriquement. On peut cependant avancer qu'a priori la simulation numérique est plus proche de la réalité. En effet, le couple théorique est calculé en considérant que la cellule se comporte comme un dipôle : les multipôles d'ordre supérieurs sont donc négligés. Or, ils peuvent intervenir quand le champ électrique extérieur n'est pas uniforme [126], ce qui est le cas ici puisque le dispositif à quatre électrodes ne génère pas un champ électrique parfaitement uniforme dans la région où est placée la cellule. Par contre, dans le code éléments finis, le couple est calculé en utilisant le tenseur de Maxwell : tous les multipôles sont donc pris en compte dans la limite du pas de maillage.

4.2.2 Modèles d'agrégats

Le code éléments finis étant validé, nous pouvons effectuer des expériences numériques avec des agrégats de cellules. Trois modélisations sont proposées. Dans la première, on considèrera un agrégat de cellules très concentrées afin de voir l'effet éventuel des jonctions intercellulaires. Dans la seconde hypothèse, on cherchera à voir au contraire l'effet quand les cellules sont plus ou moins diluées dans le milieu extracellulaire. Enfin, dans le dernier modèle, l'agrégat sera composé de cellules de différentes tailles.

Cellules très concentrées

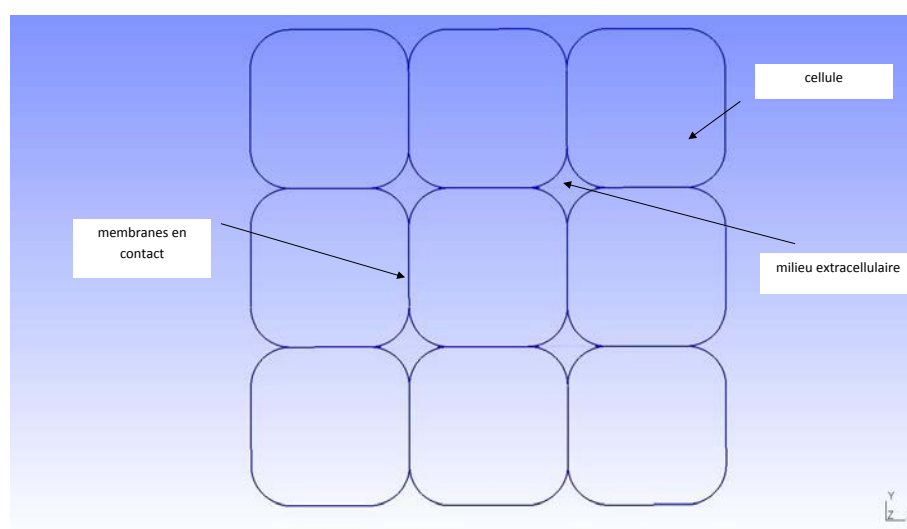


FIGURE 4.5 – Géométrie de l'agrégat dans le cas où les cellules sont concentrées.

On considère un agrégat de 9 cellules (voir figure 4.5). Ce choix s'explique par le fait que c'est le nombre minimal qui garantit qu'au moins une cellule est totalement entourée par d'autres cellules. Afin de voir l'effet éventuel des jonctions intercellulaires, on considère un agrégat de cellules dont la forme a été modifiée afin d'augmenter la surface de contact entre deux cellules voisines. Cette hypothèse est réaliste comme le montre par exemple les agrégats qui ont été obtenus dans le chapitre III figure (3.2).

Lorsque deux membranes sont en contact, la modélisation doit être corrigée : l'admittance Y_m qui caractérise une membrane est remplacée par une admittance égale à $Y_m/2$ dans la mesure où les deux membranes en contact peuvent être vues comme une seule membrane d'épaisseur deux fois plus grande. On peut compléter ce modèle en ajoutant une conductance $G_{jonction}$ pour tenir compte des jonctions intercellulaires [127] ; comme ces jonctions relient les membranes de deux cellules

voisines, les impédances $2/Y_m$ et $1/G_{jonction}$ sont en série : l'admittance totale est donnée par $1/(2/Y_m + 1/G_{jonction})$.

Par ailleurs, la figure 4.5 fait apparaître quatre zones que l'on peut considérer comme le milieu extracellulaire. Les propriétés électriques de ce milieu n'ont évidemment pas été déterminées dans le chapitre 2. Néanmoins, on peut considérer que ces propriétés sont de l'ordre de grandeur de celles du cytoplasme. La permittivité relative du cytoplasme donnée dans le (Table 2.1) chapitre II est de 85 c'est-à-dire très proche de 80, la permittivité relative de l'eau ; le milieu extracellulaire étant lui aussi grandement constitué l'eau, sa permittivité relative doit raisonnablement être proche de 85. S'agissant de la conductivité, l'hypothèse est plus discutable. La conductivité du cytoplasme est de 0.408 S/m et on sait que la conductivité équivalente du rein donnée figure 4.1 est comprise entre 0.1 et 0.8 S/m . Nous proposons donc de simuler le comportement de l'agrégat pour trois valeurs de la conductivité : 0.204 , 0.408 et 0.816 S/m . A ce stade, l'effet éventuel des jonctions intercellulaires ne sera pas décrit : $G_{jonction} \rightarrow \infty$. Les résultats de simulation sont donnés figure 4.6.

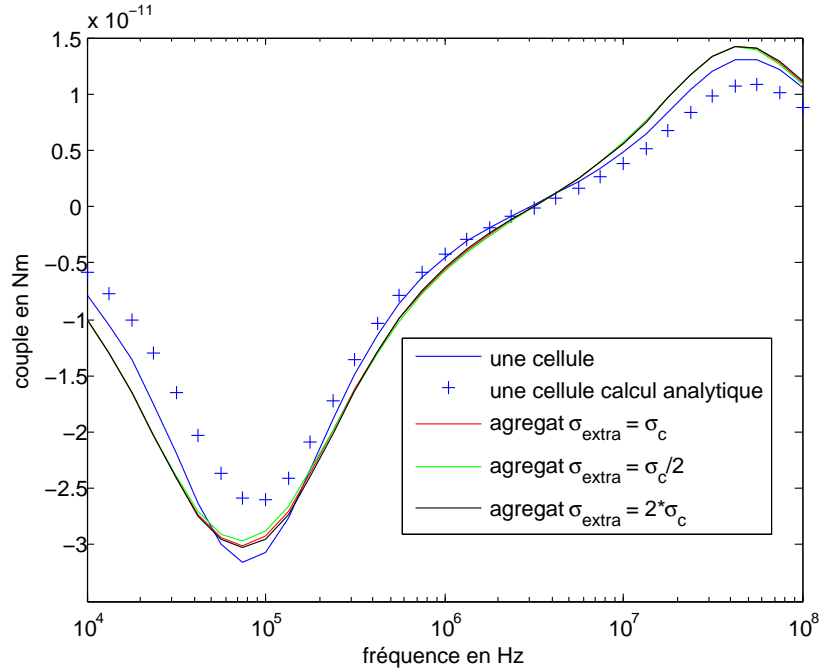


FIGURE 4.6 – Couple pour une cellule isolée et un agrégat suivant la conductivité du milieu extracellulaire. Dans le cas de l'agrégat, le couple est divisé par 9 pour faciliter la comparaison ; ce facteur vient du fait que le couple attendu est proportionnel à la surface comme le montre l'équation 4.7.

La première observation que l'on peut faire est que le spectre pour une cellule isolée est légèrement plus éloigné du spectre calculé analytiquement que dans le cas des résultats obtenus pour une cellule ronde (voir figure 4.4). La forme de la cellule joue donc un peu sur le spectre obtenu. Pour le reste, on constate que l'agrégat modélisé se comporte quasiment comme une cellule et ce quelque soit la conductivité du milieu extracellulaire. L'explication tient au fait que la surface occupée par le milieu extracellulaire est petite au regard de la surface occupée par les cellules : dans le cas de la géométrie donnée figure 4.5, le milieu extracellulaire représente 2.5% de la surface de l'agrégat.

Une autre hypothèse pour expliquer le comportement électrique de l'agrégat est d'introduire l'effet des jonctions intercellulaires. Nous ne disposons d'aucune donnée pour fixer la valeur de $G_{jonction}$. On peut cependant avancer que si les jonctions intercellulaires ont un effet, ce dernier est d'augmenter la conductivité entre les deux membranes. Etant donné en effet que la conductance de la membrane G_m est négligée, l'admittance Y_m se réduit à la capacité de la membrane C_m ; dans ces conditions, la conductance $G_{jonction}$ pourrait jouer un rôle sur les effet à l'interface entre la membrane et le cytoplasme. La figure 4.7 rapporte les résultats numériques obtenus pour différentes valeurs de $G_{jonction}$, la valeur de la conductivité pour le milieu extracellulaire ayant été fixée à 0.408 S/m .

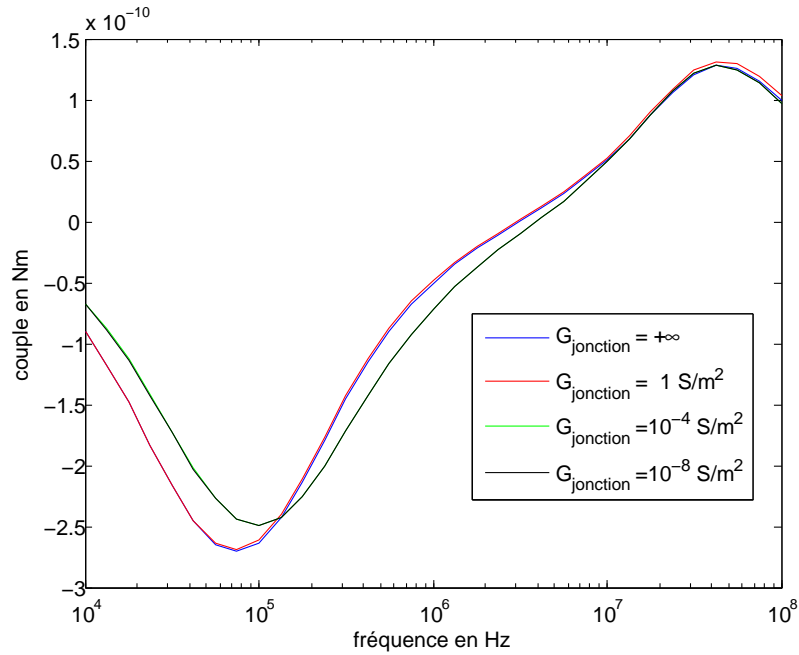


FIGURE 4.7 – Couple pour un agrégat suivant la conductance des jonctions intracellulaires.

On constate qu'il n'y a aucun effet quand $G = 1 \text{ S/m}^2$ mais que les jonctions extracellulaires joueraient un rôle quand $G_{jonction} = 10^{-4} \text{ S/m}^2$. Cet effet resterait le même quand $G_{jonction} = 10^{-8} \text{ S/m}^2$. Il faut avoir ici à l'esprit que l'agrégat ne fait apparaître des jonctions intercellulaires que pour une partie des cellules, les cellules à la périphérie de l'agrégat étant principalement entourées de la même membrane qu'une cellule isolée. Par ailleurs, on peut s'interroger sur la validité du modèle : la conductance $G_{jonction}$ est si faible que les effets capacitifs qui ont été négligés pourraient dominer. De manière plus générale, les jonctions intercellulaires et plus précisément les jonctions gap ont été identifiées comme jouant un rôle pour la relaxation associée plutôt à la dispersion α qu'à la dispersion β [120].

Cellules diluées dans le milieu extracellulaire

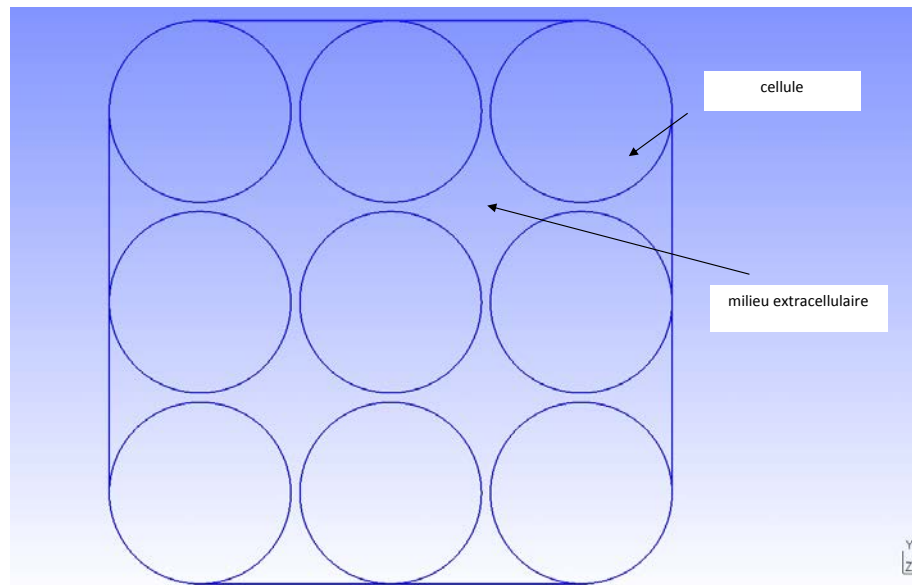


FIGURE 4.8 – Géométrie de l'agrégat dans le cas où les cellules sont diluées à 25%.

Pour expliquer les différences entre les caractéristiques de la cellule isolée et du tissu, on peut invoquer le milieu extracellulaire. Dans la section précédente, les simulations ne montraient pas d'effet du milieu extracellulaire car sa proportion était faible dans la constitution de l'agrégat (seulement 2.4 % de la surface totale). On propose ici de réaliser des expériences numériques avec des agrégats où les cellules seraient plus ou moins diluées.

La figure 4.8 montre un agrégat où les cellules sont diluées à 25 % ; autrement dit un agrégat où le milieu extracellulaire représente 25% de la surface totale. Dans ce modèle, les cellules ne sont pas en contact avec leurs voisines. C'est a priori en contradiction avec ce que l'on a décrit dans la section précédente. Cependant, on

a montré que les jonctions intercellulaires n'avaient aucun rôle dans le comportement électrique de l'agrégat dans la gamme de fréquences $10\text{ kHz} - 100\text{ MHz}$. Par ailleurs, dans un tissu les cellules peuvent s'agréger par paquets comme on l'a décrit précédemment mais ces agrégats peuvent eux-mêmes être dilués dans le milieu extracellulaire. Voilà pourquoi le modèle proposé 4.8 peut être pertinent pour décrire le rôle éventuel du milieu extracellulaire. Notons que les cellules ont une forme circulaire car on a également vu dans la section précédente que la forme de la cellule influait peu sur le spectre d'électrorotation obtenu.

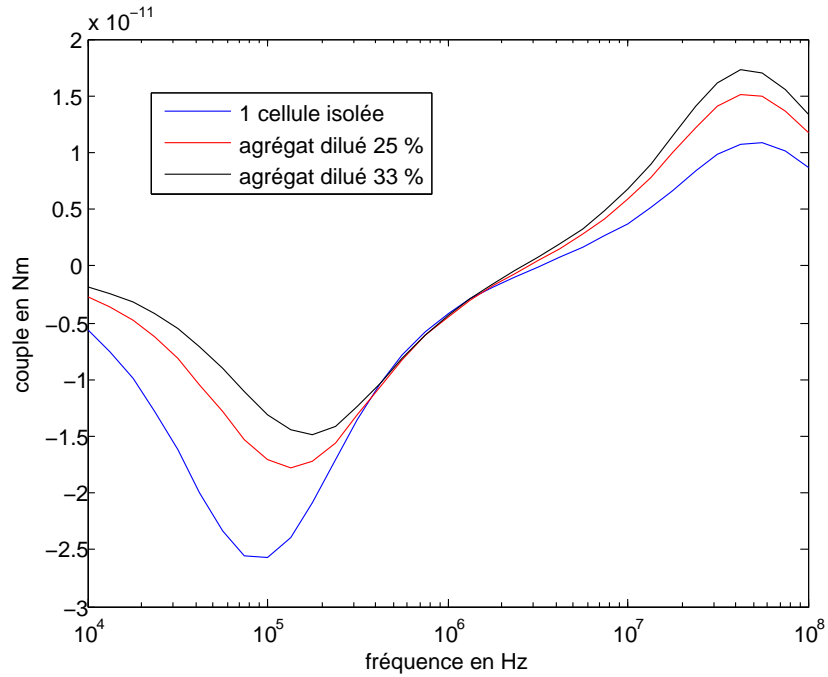


FIGURE 4.9 – Couple pour une cellule isolée et un agrégat suivant la dilution des cellules dans le milieu extracellulaire. Dans le cas de l'agrégat, le couple est divisé par 9 pour faciliter la comparaison. Les propriétés électriques du milieu extracellulaire sont les mêmes que celles du cytoplasme.

Une première expérience numérique consiste à analyser l'effet de la dilution des cellules. La modélisation du milieu extracellulaire pose, comme dans la section précédente, le problème de la définition des propriétés électriques. On choisit ici les mêmes conductivité et permittivité pour le cytoplasme et le milieu extracellulaire : cela permettra de mettre en lumière l'effet propre de la dilution. Les agrégats sont construits avec des cellules de même taille ; pour augmenter la dilution des cellules, on les éloigne donc plus les unes des autres. La figure 4.9 montre les spectres obtenus pour des agrégats dilués à 25% et 33%.

On constate que la dilution des cellules a un effet notable sur la résonance anti-field : plus les cellules sont diluées et moins cette résonance est marquée ; de plus cette résonance se décale vers les hautes fréquences. Ce résultat va dans le sens du spectre d'électrorotation obtenu avec les propriétés électrique du rein où la résonance anti-field apparaît autour de 400 kHz avec une amplitude 4 fois plus faible que la résonance co-field (voir figure 4.2). S'agissant de la résonance co-field, la dilution des cellules n'a pas d'effet car les propriétés du milieu extracellulaire sont les mêmes que celles du cytoplasme. La différence constatée sur l'amplitude est due au fait que la taille de l'agrégat augmente quand les cellules sont plus diluées dans le milieu extracellulaire.

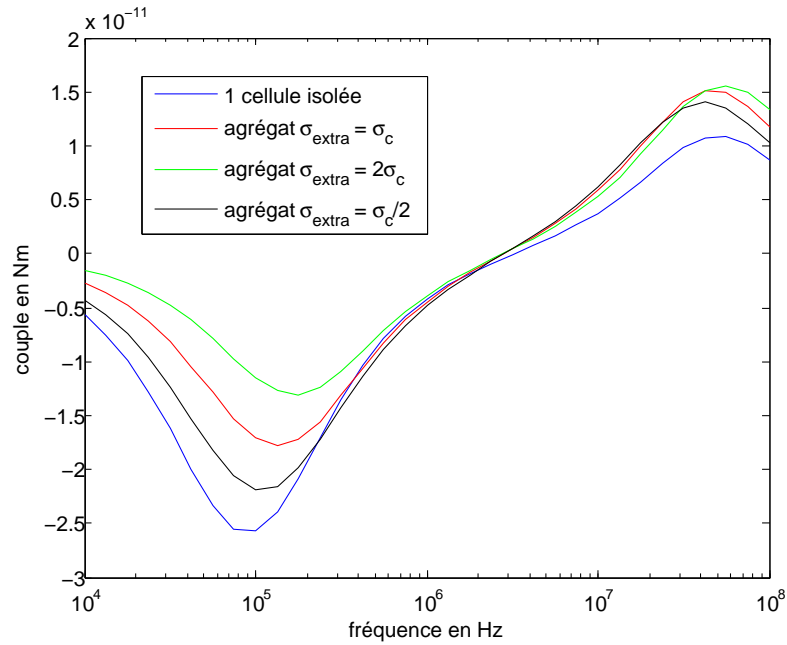


FIGURE 4.10 – Couple pour une cellule isolée et un agrégat suivant la conductivité du milieu extracellulaire quand les cellules sont diluées à 25%. Dans le cas de l'agrégat, le couple est divisé par 9 pour faciliter la comparaison.

Pour compléter cette étude, on propose de modifier la conductivité du milieu extracellulaire comme cela a été discuté dans la section précédente. La figure 4.10 montre que quand la conductivité du milieu extracellulaire augmente la résonance anti-field est moins marquée et dans même temps la résonance cofield se décale vers les hautes fréquences. Ce résultat va dans les sens du spectre d'électrorotation obtenu avec les propriétés électriques du rein (voir figure 4.2).

Cellules de tailles différentes

Dans la sous-section 4.1.1, nous avons évoqué que les différences de propriétés électriques entre une cellule isolée et un tissu trouvent aussi leur origine dans le fait qu'un tissu est constitué de cellules de tailles différentes. On se propose ici de modéliser un agrégat avec des cellules de différentes tailles.

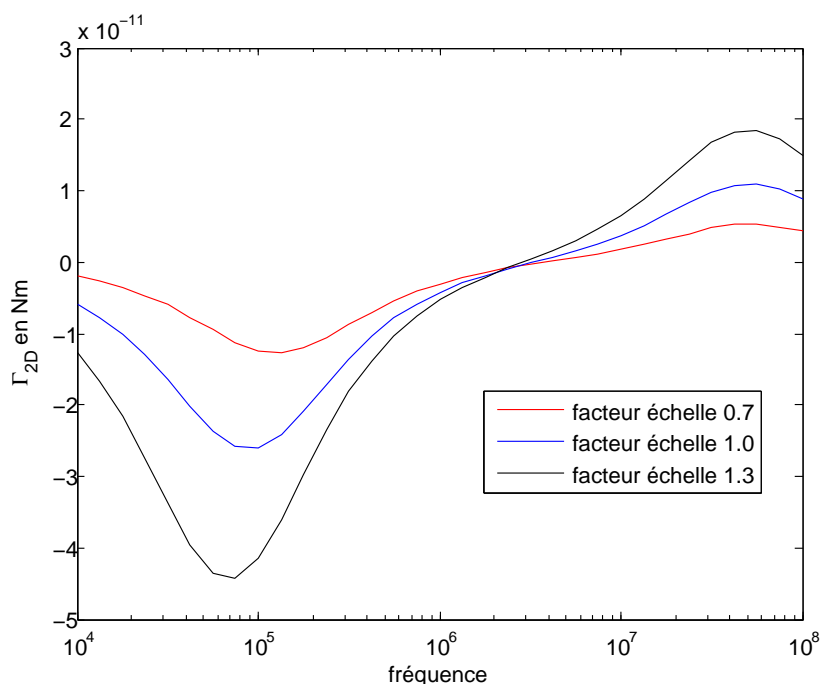


FIGURE 4.11 – Couple pour une cellule isolée pour différentes tailles. Le facteur d'échelle égal à 1 correspond à la cellule ayant un rayon de $10 \mu m$ et dont les propriétés électriques sont celles rapportées dans le chapitre II (Table 2.1).

Dans un premier temps, on peut s'intéresser au spectre d'électrorotation de cellules isolées ayant différentes tailles. La figure 4.11 donne le spectre d'électrorotation d'une cellule HEK pour trois valeurs d'un facteur d'échelle que l'on applique sur le rayon de la cellule uniquement ; l'épaisseur de la membrane reste quant à elle la

même car la structure de la membrane (bi-couche lipidique) varie peu d'une cellule à l'autre.

On constate dans la figure 4.11 que plus la cellule est grande, plus l'amplitude du couple est élevée comme on peut s'y attendre. Une autre observation concerne la résonance anti-field : la fréquence du pic varie avec la taille de la cellule entre 70 kHz et 120 kHz pour des facteurs d'échelle allant de 0.7 à 1.3. Cette distribution sur la résonance anti-field suivant la taille de la cellule devrait affecter le spectre d'électrorotation d'un agrégat constitué de cellules de différentes tailles.

On construit dans un deuxième temps un agrégat de cellules de différentes tailles avec un facteur d'échelle compris entre 0.7 à 1.3. La figure 4.12 montre la géométrie de l'agrégat obtenu.

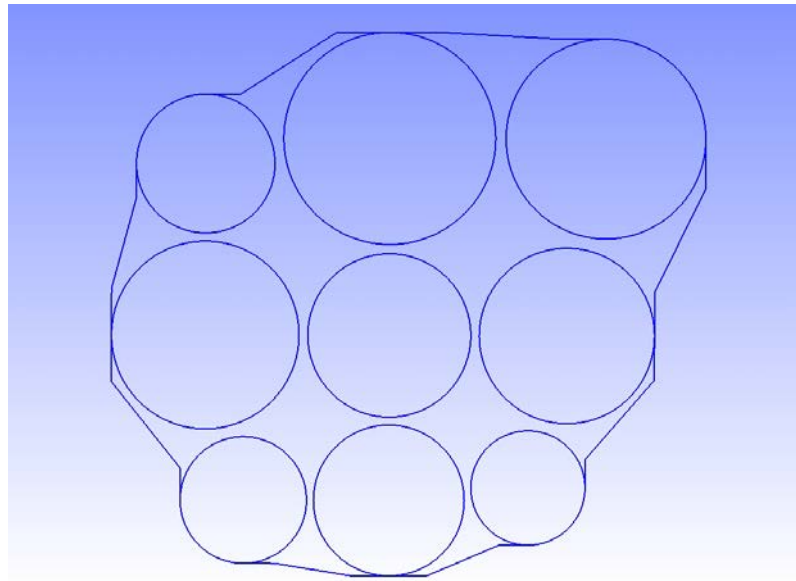


FIGURE 4.12 – Géométrie d'un agrégat constitué de cellules de tailles différentes. Les cellules sont diluées à 25%.

Les expériences numériques effectuées à partir de ce modèle d'agrégat sont rapportées figure 4.13. On constate que le fait d'introduire des cellules de taille différente ne modifie pas le comportement électrique obtenu dans le cas où les cellules sont identiques. Quand les cellules de taille différente sont plongées dans le bain, on observe un léger décalage de la fréquence de résonance anti-field (75 kHz) par rapport à une cellule isolée (100 kHz). Ce résultat est dû à l'influence prépondérante des cellules de plus grande taille comme cela a été discuté précédemment (voir figure 4.11). Dans le cas de l'agrégat, la fréquence du pic anti-field est quasiment la même pour un agrégat constitué de cellules de tailles différentes et de cellules identiques. La présence du milieu extracellulaire et en particulier l'effet de la dilution des cellules

atténue les petites différences observées quand les cellules isolées sont plongées dans le bain.

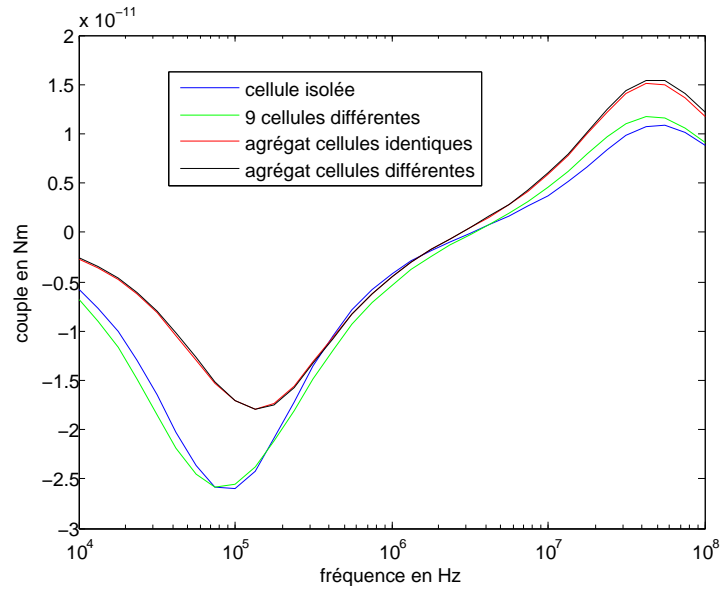


FIGURE 4.13 – Couple pour des cellules isolées et des agrégats. Dans le cas des agrégats et des 9 cellules différentes, le couple est divisé par 9 pour faciliter la comparaison. Dans le cas des 9 cellules différentes, les cellules du modèle figure 4.12 sont plongées dans le bain ; autrement dit il n’y a pas de milieu extracellulaire. Dans le cas des agrégats, que les cellules soient identiques ou différentes, le milieu extracellulaire a les mêmes propriétés électriques que le cytoplasme.

4.3 Conclusion

Ce chapitre visait à établir un lien entre le comportement électrique d'une cellule isolée HEK et celui d'un agrégat de cellules HEK. Dans un premier temps, nous avons comparé les courbes des propriétés électriques homogénéisées d'une cellule HEK avec celles du tissu du rein d'embryon humain. Nous constatons une différence au niveau de l'allure des deux courbes. En effet, la permittivité électrique du tissu en fonction de la fréquence ne fait pas apparaître le palier lié à la dispersion β qui traduit l'effet de Maxwell Wagner, contrairement à celle de la cellule. Les deux explications avancées justifiant cette différence sont :

- L'effet du milieu extracellulaire sur les propriétés électriques du tissu qui n'est pas pris en compte dans le cas d'une cellule isolée.
- Le tissu est constitué de cellules de tailles différentes, ce qui pourra modifier la dispersion β .

Afin d'évaluer la pertinence de ces deux explications, des simulations numériques en éléments finis de spectre d'électrorotation ont été effectuées. Les résultats de ces simulations mettent en évidence, d'une part, que l'augmentation de la proportion de milieu extracellulaire de 2.5% à 25% combinée à l'augmentation de la conductivité électrique de ce milieu modifie le spectre d'électrorotation. En effet, la résonance anti-field diminue et se décale vers les hautes fréquences. Donc à des proportions importantes, le milieu extracellulaire modifie le spectre d'électrorotation, ce qui modifiera également les propriétés électriques du tissu. D'autre part, les résultats montrent qu'en augmentant la taille de la cellule, l'amplitude du spectre d'électrorotation augmente. Cependant, le spectre d'électrorotation d'un tissu constitué de cellules de même taille est quasi identique à celui d'un tissu constitué de cellules de tailles différentes.

Ces premiers éléments doivent être confortés par d'autres études, notamment à caractère expérimental. Un prototype de dispositif d'électrorotation constitué d'électrodes épaisses a été développé à cet effet et est présenté en annexe de ce chapitre.

Appendices

Annexe B

Facteur de Clausius Mossotti en deux dimensions

Pour déterminer l'expression analytique du facteur de Clausius Mossotti en deux dimensions, on peut s'appuyer sur l'approche des moments effectifs décrite dans la littérature pour le cas à trois dimensions [126].

Considérons un dipôle électrique $\vec{p} = q\vec{d}$ placé dans le vide dans un espace à deux dimensions. Le potentiel électrique ϕ créé par le dipôle électrique est donné par :

$$\phi(r) = \frac{\vec{p} \cdot \vec{r}}{2\pi\epsilon_0 r^2} \quad r \gg d \quad (\text{B.1})$$

où \vec{r} est le vecteur radial défini depuis le milieu du dipôle.

Considérons maintenant un disque diélectrique de permittivité ϵ_1 et de rayon R plongée dans le vide dans un espace à deux dimensions. En présence d'un champ électrique extérieur uniforme \vec{E}_0 , le disque se polarise électriquement et peut alors être vu comme un dipôle quand on se place en dehors du disque ($r \geq R$). Pour caractériser ce dipôle, on propose de calculer le potentiel électrique induit ϕ_{ind} par le disque pour une polarisation du champ électrique extérieur donnée. Fixons par exemple $\vec{E}_0 = E_0 \hat{x}$ dans le repère cartésien $\{\hat{x}, \hat{y}\}$; la résolution du problème électrostatique conduit à la solution suivante :

$$\phi_{ind}(r) = R^2 \frac{\epsilon_1 - \epsilon_0}{\epsilon_1 + \epsilon_0} \frac{\vec{E}_0 \cdot \vec{r}}{r^2} \quad r \geq R \quad (\text{B.2})$$

En égalisant les équations B.1 et B.2, on peut déduire le dipôle électrique induit par le disque :

$$\vec{p} = 2\pi\epsilon_0 R^2 K_{2D} \vec{E}_0 \quad (\text{B.3})$$

où le facteur de Clausius Mossotti est déterminé par analogie avec le résultat obtenu en trois dimensions (voir le chapitre I (Formule (1.1))).

$$K_{2D} = \frac{\epsilon_1 - \epsilon_0}{\epsilon_1 + \epsilon_0} \quad (\text{B.4})$$

Par ailleurs, le couple en deux dimensions donné dans l'équation 4.7 peut être dérivé en suivant la démarche décrite dans la littérature dans le cas à trois dimensions [126] et dont le résultat est rappelé dans le chapitre I (Formule (1.5)).

Annexe C

Fabrication d'un système d'électrodes épaisses pour l'électrorotation

Le microsystème que nous souhaitons fabriquer est composé de quatre électrodes polynomiales (contours comparables à ceux définis au chapitre 2) permettant de générer un champ uniforme sur une épaisseur d'une centaine de micromètres. A cet effet, nous proposons de réaliser des électrodes épaisses en PDMS dopé au carbone (c-PDMS) et de les intégrer dans un dispositif microfluidique.

C.1 Le cPDMS

C.1.1 Les matériaux nanocomposites

Les nanocomposites sont formés à partir de la dispersion de nanomatériaux (nanoparticules, nanotubes, nanofils...) jouant le rôle de dopants dans une matrice pouvant être d'origine métallique, céramique ou organique [128]. Dans ce qui suit, nous nous intéressons aux nanocomposites à matrice organique (polymères). Ces derniers ont suscité l'intérêt des chercheurs et des industriels depuis leur création [129]. En effet, ils ont permis l'élargissement du champ d'application des polymères en leur fournissant de nouvelles caractéristiques [130] [131].

En particulier, en intégrant des dopants à base de carbone ou de métaux dans un polymère tel que le PDMS, celui-ci peut être rendu conducteur.

Les nanotubes de carbone /nanofibres de carbone développées en phase vapeur

Pour le dopage des matrices polymères, les nanotubes de carbone (CNT) (C.1a) et les nanofibres de carbone développées en phase vapeur (VGCNF¹) (C.1b) sont souvent utilisés en raison de leurs propriétés mécaniques, électriques et thermiques

1. vapor grown carbon nanofibers

avantageuses. Les CNT se présentent sous forme d'un réseau hexagonal d'atomes de

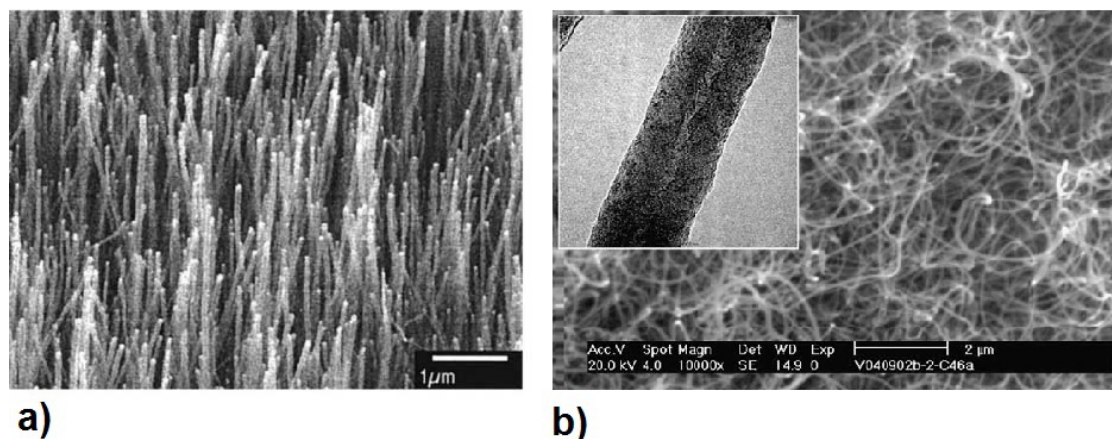


FIGURE C.1 – a) Image MEB (Microscopie électronique à balayage) de nanotubes de carbone de diamètre 40-50 μm [132]. b) Image MEB de nanofibres de carbone synthétisées en phase vapeur. L'encart montre une image TEM (Microscopie électronique à transmission) d'une fibre de carbone de diamètre 100 nm [133].

carbone, enroulés sur eux-mêmes de manière à former des structures cylindriques. Leur structure symétrique semblable à des cages de carbone leur offre de bonnes propriétés mécaniques (module d'élasticité² supérieur à 1 Terapascal), une bonne conductivité thermique (deux fois plus élevée que celle du diamant) et électrique (1000 fois supérieure à celle d'un fil de cuivre) [132]. Les VGCNF sont des fibres de carbone ayant eu une croissance sous 1000-1300 °C en phase vapeur, par décomposition d'hydrocarbures tels que le méthane, en utilisant des particules de métal en tant que catalyseur [134]. Leur structure offre d'excellentes propriétés mécaniques (module d'élasticité d'environ 240 Gigapascal) ainsi que des conductivités électriques (résistivité de $5.10^{-5} \Omega.\text{cm}$ d'après [135]) et thermique très élevées. Les CNT ont retenu plus d'attention que les VGCNF. Ceci est dû à leurs propriétés mécaniques supérieures et leur densité inférieure à celle des VGCNF. Toutefois, la disponibilité et le prix relativement bas des VGCNF font d'elles une bonne alternative aux CNT [136]. C'est pour ces raisons que nous avons choisi de doper du PDMS avec ce matériau.

2. la constante qui relie la contrainte au taux de déformation d'un matériau isotrope soumis à une compression isostatique.

C.1.2 Préparation du cPDMS

Le cPDMS préparé ici est un mélange de nanofibres de carbone (VGCNF) (719781-25G ; Sigma ; D_xL=100 nm x 20-200 μ m) et de PDMS (Sylgard 184, Neyco). Les étapes de préparation sont les suivantes :

- Préparation d'un mélange PDMS prépolymère/agent réticulant (rapport massique 10 :1).
- Dégazage du PDMS dans un dessiccateur, afin d'éliminer les bulles d'air.
- Ajout de nanofibres de carbone au PDMS progressivement, en mélangeant doucement avec une spatule métallique, jusqu'à obtention de la texture souhaitée (texture compacte et pâteuse, permettant l'étalement ultérieur du cPDMS sur un moule pour le structurer). Le mélange utilisé contient environ 4% de nanofibres de carbone (en rapport massique).

Il est à noter que les nanofibres de carbone sont toxiques [137] et doivent donc être manipulées en prenant certaines précautions (port de blouse, gants et lunettes avec protections latérales, utilisation d'un respirateur avec filtre à nanoparticules...).

C.2 Fabrication des électrodes en cPDMS et intégration dans un système microfluidique

Les étapes du protocole développé, permettant l'intégration de quatre électrodes en cPDMS dans un système microfluidique se présentent ainsi :

- Fabrication d'un moule microstructuré en résine sèche (film bleu).
- Réalisation de quatre électrodes en remplissant les ouvertures du moule avec du cPDMS.
- Réalisation d'un capot en PDMS intégrant les électrodes en cPDMS.

Après démoulage, l'ensemble électrodes/capot PDMS ainsi obtenu sera collé sur un wafer en verre portant quatre électrodes en or (reprises de contact pour l'alimentation des électrodes en cPDMS).

C.2.1 Fabrication du moule microstructuré

Le moule microstructuré est obtenu par photolithographie sur résine photosensible. La résine utilisée est une résine sèche négative (LAMINAR® E9220), communément appelée "film bleu" [138]. Son épaisseur est de 50 μ m.

La figure C.2 illustre les deux étapes principales de fabrication du moule. La première consiste à laminer à la main deux épaisseurs de film bleu sur une lame de verre, lavée au préalable avec de l'acétone et de l'éthanol, puis séchée à l'azote. Avant laminage, le film protégeant la résine doit être retiré. Dans une deuxième étape, les deux couches de résine sont insolées sous lampe UV (à 25 mW/cm² pendant 5 s) à travers un masque en plastique portant les motifs des électrodes. Après un recuit de 20 s à 105 °C, les parties non insolées sont développées dans un bain de Na₂CO₃.

pendant 3 min environ, sous agitation. Les lames sont ensuite lavées à l'eau DI, séchées à l'azote puis replacées sur la plaque chauffante pour un second recuit de 20 s à 105 °C. Le résultat obtenu est un moule de 100 μm d'épaisseur présentant des ouvertures aux endroits où seront formées les électrodes.

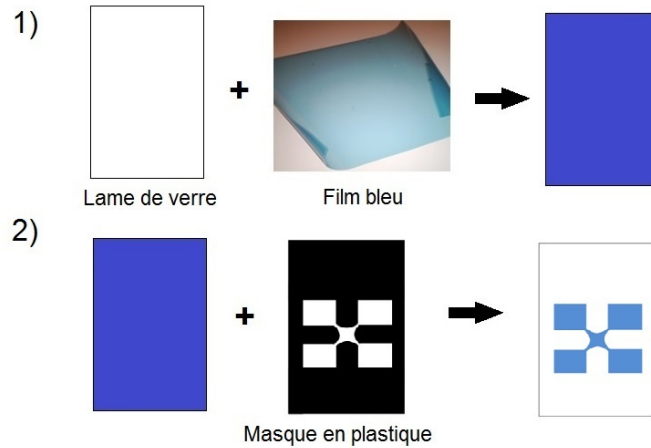


FIGURE C.2 – Fabrication du moule microstructuré. 1) Laminage du film bleu sur une lame de verre. 2) Motifs obtenus après photolithographie et gravure au carbonate de sodium Na_2CO_3 .

C.2.2 Réalisation des électrodes en cPDMS.

La figure C.3 représente les étapes de fabrication des électrodes en cPDMS à partir du moule en film bleu.

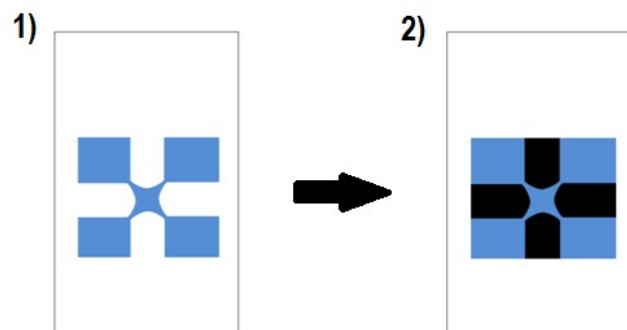


FIGURE C.3 – Principe de réalisation des électrodes en cPDMS. 1) Moule en film bleu. 2) cPDMS étalé sur le moule.

Le cPDMS préparé précédemment est étalé sur le moule de manière uniforme à l'aide d'une lame de verre propre. L'ensemble est placé au four pendant 1 h à 80 °C afin d'accélérer la polymérisation du cPDMS. Un chiffon imbibé d'éthanol permet d'éliminer les éventuelles fibres résiduelles se trouvant dans l'espace inter-électrodes.

C.2.3 Réalisation d'un capot en PDMS intégrant les électrodes en cPDMS.

Cette étape consiste à recouvrir les lames obtenues au paragraphe précédent avec du PDMS contenant 10 % d'agent réticulant. L'ensemble est ensuite placé au four à 80 °C pendant 2h. Puis on procède au démoulage manuel du PDMS. Notons que l'adhésion entre le PDMS et le cPDMS est bonne, bien que les polymérisations respectives de chacun des deux matériaux n'aient pas été effectuées simultanément [121]. Au final, on obtient des électrodes en cPDMS d'épaisseur 100 μm intégrées dans un capot en PDMS d'épaisseur 5 mm environ (Figure C.4).

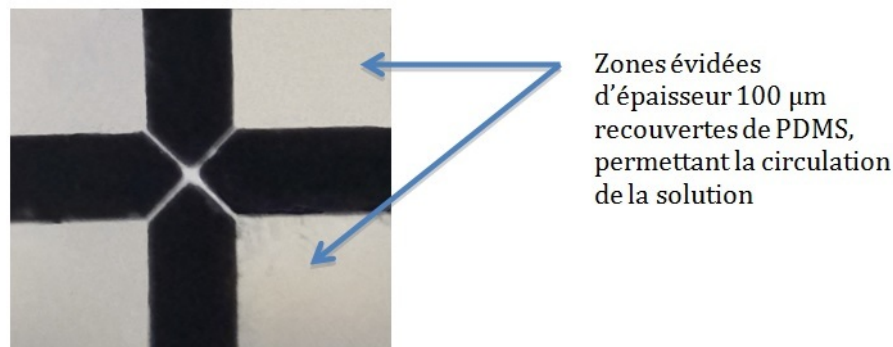


FIGURE C.4 – Electrodes en cPDMS recouvertes de PDMS.

Deux trous cylindriques sont ensuite réalisés à chaque extrémité du réservoir, en perçant le PDMS sur toute son épaisseur à l'aide d'un poinçon. Cette étape vise à permettre l'insertion après collage de capillaires acheminant la solution dans le micro-réservoir. La dernière étape de fabrication du microsysteme consiste à refermer le micro-réservoir par collage plasma sur un wafer en verre³. Il s'agit d'un collage irréversible qui assure l'étanchéité entre le PDMS et le verre. Le wafer en verre utilisé comporte des électrodes en Cr/Au réalisées par lift-off, servant de reprises de contact (Figure C.5). Les électrodes en cPDMS sont donc alignées au-dessus de ces dernières à l'issue du traitement plasma. Le dispositif final est présenté figure C.6.

3. plasma à air, exposition des deux surfaces à coller au plasma durant 2 min 30 s

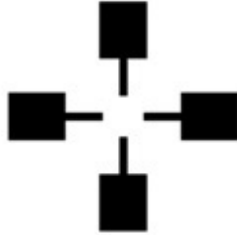


FIGURE C.5 – Représentation des électrodes servant de reprises de contact pour la connexion des sources de tension servant à produire le champ électrique tournant.

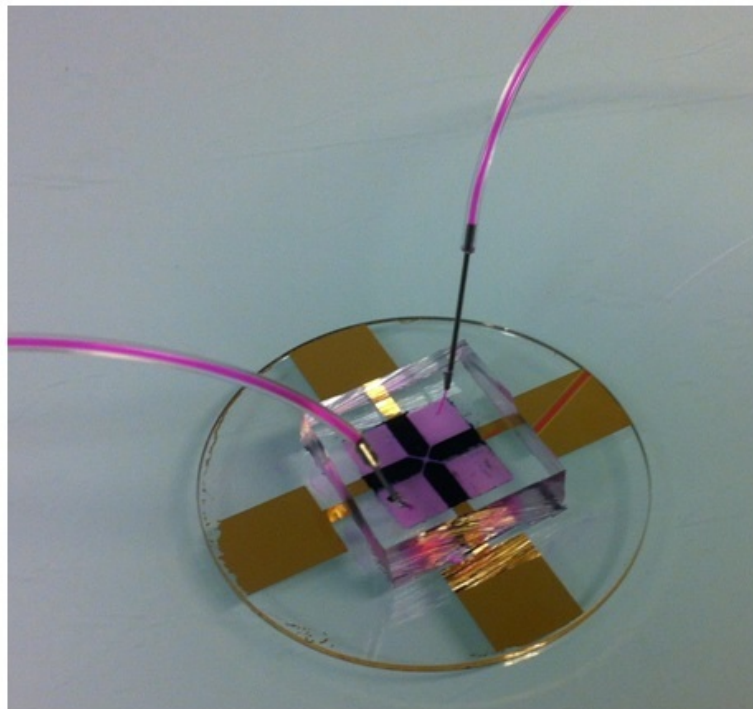


FIGURE C.6 – Dispositif final rempli d'encre pour mettre en évidence la structure du micro-réservoir.

Chapitre 5

Conclusion générale et perspectives

5.1 Conclusion générale

L'objectif des travaux menés au cours de cette thèse est la compréhension du lien existant entre le comportement électrique d'une cellule isolée HEK et celui d'un agrégat de cellules HEK.

Dans le premier chapitre, une présentation générale de la cellule et du tissu biologique a été effectuée. Après avoir décrit la cellule et le tissu, du point de vue de leur structure biologique et de leur comportement électrique, différentes techniques de caractérisation électrique ont été présentées. Nous nous sommes intéressés principalement à l'électrorotation et la spectroscopie de bioimpédance. Pour ces deux techniques, différents exemples d'applications ont été présentés, permettant ainsi de montrer l'importance de ces techniques dans la caractérisation électrique des cellules et des tissus biologiques. La dernière partie de ce chapitre est dédiée aux techniques de formation d'agrégats de cellules biologiques. L'approche "bottom-up" basée sur l'assemblage de cellules par diélectrophorèse est apparue comme particulièrement adaptée à la formation d'agrégats de taille et de forme contrôlées.

La caractérisation électrique des cellules HEK par électrorotation a fait l'objet du deuxième chapitre. Le choix de travailler avec des HEK se justifiait par le fait que ce sont des cellules adhérentes comme la majorité des cellules constituant les tissus solides. Dans ce cadre, nous avons présenté dans un premier temps le dispositif expérimental ayant permis la réalisation des expériences d'électrorotation. La méthode suivie pour l'acquisition et le traitement des vidéos de la rotation des cellules HEK a été détaillée. Ensuite, nous avons présenté le spectre d'électrorotation obtenu expérimentalement. En se basant sur ce spectre et sur les équations théoriques caractéristiques de l'électrorotation, nous avons extrait les paramètres électriques des cellules HEK. Les résultats obtenus sont très proches de ceux existant dans la littérature. Cela nous a permis de valider le banc expérimental. Une étude complémentaire

a été effectuée pour permettre d'évaluer l'effet d'un champ magnétique statique de 0.5 T sur les cellules HEK, en utilisant la technique d'électrorotation.

Le troisième chapitre portait sur la formation d'agrégats de cellules HEK. Dans ce but, deux techniques ont été présentées. La première était basée sur la jonction adhérente, dépendante de la concentration du calcium, qui relie les cellules entre elles. En effet, grâce à des protéines transmembranaires telles que la E-Cadhérine, cette jonction permet d'établir des liaisons entre les cytosquelettes des cellules. Les agrégats de cellules obtenus sont permanents, de forme plus ou moins homogène. La taille de ces agrégats est contrôlable en jouant sur la concentration du calcium dans le milieu de suspension. La deuxième technique de formation d'agrégats exploite la force diélectrophorétique pour assembler les cellules en amas. Dans ce but, un réseau d'électrodes quadripolaires a été réalisé. Cette configuration d'électrodes est très adaptée à la formation d'agrégats, car elle permet de focaliser efficacement les cellules au centre de l'espace inter-électrodes sous l'effet d'un champ électrique uniforme. La technique de fabrication de ces électrodes a été présentée. Nous avons donc réussi à former des agrégats de cellules de forme et taille précises sous l'effet de la diélectrophorèse négative. En jouant sur la durée d'exposition au champ électrique, des agrégats permanents ont été obtenus.

Dans l'objectif de comprendre le lien entre le comportement électrique d'une cellule et celui du tissu, un ensemble de simulations numériques a été réalisé dans le dernier chapitre. Nous avons montré que les propriétés électriques en fonction de la fréquence d'une cellule HEK étaient différentes de celles du tissu du rein d'embryon humain. En analysant le comportement électrique du tissu du rein, nous avons conclu que cette différence était probablement liée au milieu extracellulaire ou à la taille des cellules qui forment le tissu. Des simulations numériques de spectres d'électrorotation ont été réalisées, afin d'évaluer l'effet du milieu extracellulaire et de la taille des cellules d'un agrégat sur les propriétés électriques de ce dernier. Les résultats obtenus ont montré qu'à des proportions importantes du milieu extracellulaire, la conductivité électrique du milieu extracellulaire avait un effet sur les propriétés électriques de l'agrégat. La taille de la cellule modifie l'amplitude du spectre d'électrorotation mais aucun effet remarquable n'a été constaté entre le spectre d'électrorotation d'un tissu constitué de cellules de même taille et d'un tissu constitué de cellules de tailles différentes.

5.2 Perspectives

La suite logique de cette thèse est la caractérisation électrique expérimentale des agrégats de cellules HEK. Les perspectives de ce travail seront orientées alors vers la réalisation de microsystèmes permettant à la fois la formation des agrégats ainsi que leur caractérisation. A cet effet, un nouveau dispositif d'électrorotation intégrant des électrodes épaisses a été fabriqué. Nous prévoyons de l'employer d'une part pour la formation d'un agrégat de cellules par DEP négative et d'autre part pour la caractérisation de cet agrégat par électrorotation. Nous envisageons toutefois d'étudier d'autres solutions, notamment basées sur l'emploi de la microimpédancemétrie.

Caractérisation des agrégats de cellules par spectroscopie de bioimpédance

Une étude bibliographique a été réalisée sur l'utilisation de la technique de spectroscopie de bioimpédance pour la caractérisation des cellules et tissus biologiques (Paragaphes [1.1.4] et [1.2.4] du chapitre I).

Comme évoqué au chapitre I, l'intégration d'électrodes adaptées à l'impédancemétrie dans un canal microfluidique peut s'avérer délicate [57]. D'où l'intérêt d'utiliser des matériaux nanocomposites, permettant l'intégration d'électrodes sur les parois d'un microcanal, avec un processus de fabrication simple. Le processus de préparation du matériau nanocomposite cPDMS (carbone-PDMS) et son intégration dans un système microfluidique ont été présentés en annexe B du chapitre IV. Le micro-système que l'on souhaite fabriquer est composé de deux électrodes en cPDMS que l'on place de part et d'autre d'un microcanal (Figure 5.1). Le choix de cette géométrie se justifie par le fait que cette configuration offre une distribution du champ électrique uniforme avec une technique de fabrication accessible [58].

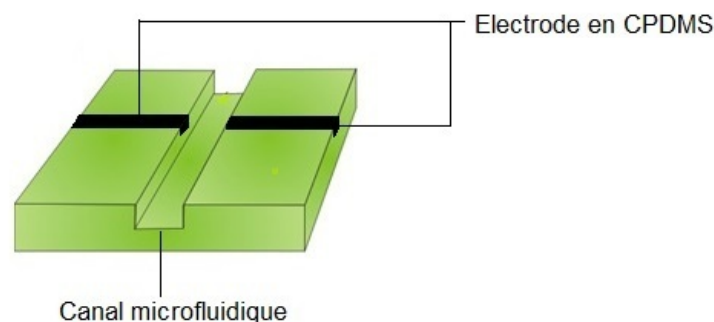


FIGURE 5.1 – Electrodes en CPDMS placées dans un canal microfluidique.

Ce microsystème devra d'abord être validé en caractérisant des particules dont on

connaît déjà les caractéristiques électriques, telles que des microbilles en polystyrène. Ensuite, il sera utilisé dans la caractérisation des agrégats.

Formation et caractérisation des agrégats dans le même dispositif

L'idée de former et caractériser les agrégats de cellules dans le même microsystème semble très intéressante. Cela va nous éviter une étape délicate, qui consiste à transporter les agrégats d'un microsystème à un autre. Le système présenté en annexe B du chapitre IV constitue une première solution. Le microsystème récemment proposé par Masashi et al. offre une autre alternative, c'est un dispositif tridimensionnel composé de deux paires d'électrodes interdigitées placées l'une au-dessus de l'autre et soumises à une tension alternative (Figure 5.2).

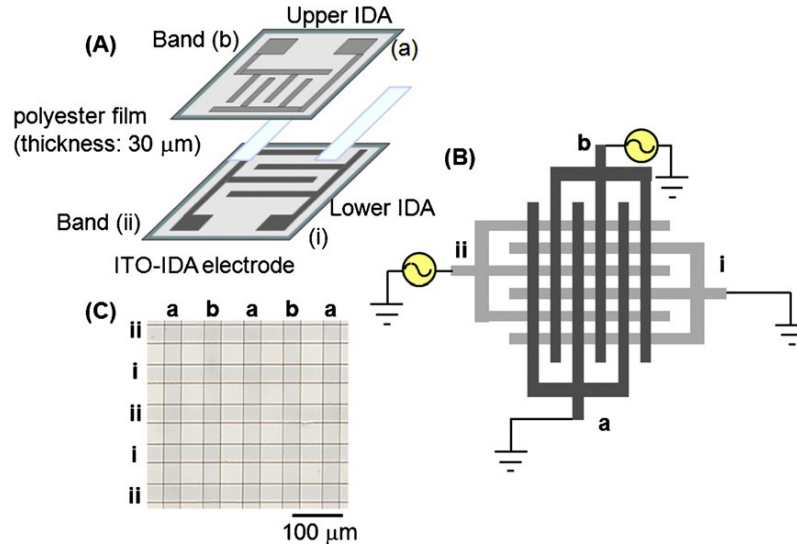


FIGURE 5.2 – A) Association des deux paires d'électrodes interdigitées. B) Mise sous tension alternative des deux réseaux d'électrodes. C) Image microscopique de l'agencement des électrodes [139].

Cette configuration permet une accumulation rapide de particules au niveau des intersections des grilles d'électrodes, car elle offre une bonne distinction entre les zones de champ minimum et celles de champ maximum. En effet, les particules s'accumulent au minimum du champ électrique par diélectrophorèse négative.

La figure 5.3 montre l'agrégation des particules aux intersections des grilles d'électrodes ainsi que la distribution du champ électrique dans ce microsystème.

En utilisant le même dispositif, nous pourrions faire aussi de l'électrorotation tridimensionnelle. En effet, l'application de quatre tensions sinusoïdales en quadrature permettra la création d'un champ électrique tournant au niveau des intersections des grilles (Figure 5.4). Ainsi, les agrégats de cellules pourront être créés par diélectrophorèse négative et caractérisés par électrorotation dans le même dispositif.

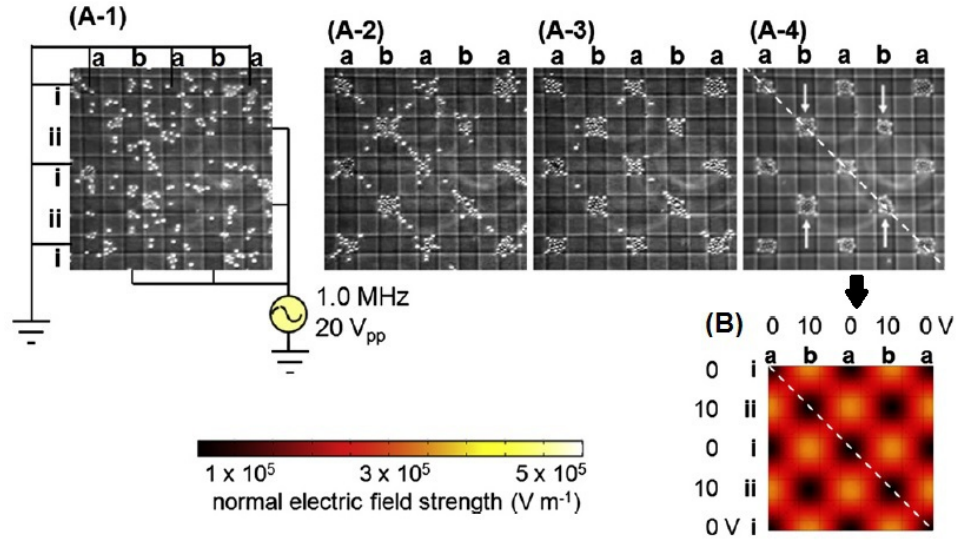


FIGURE 5.3 – Agrégation de particules en polystyrène par diélectrophorèse négative. (A-1) Avant la mise sous tension des électrodes (II) et (b) ($20V_{pp}$ à 10 MHz). (A-2) 0.33s, (A-3) 0.67s et (A-4) 1s Après la mise sous tension. (B) Simulation du champ électrique à $15 \mu\text{m}$ des électrodes de dessous [139].

La microculture de l'agrégat à l'intérieur du microsystème pourrait être envisagée grâce à l'emploi de la microfluidique (possibilité de renouveler régulièrement le milieu). La caractérisation de l'agrégat pourrait être effectuée à intervalles réguliers, afin de suivre les modifications de structure au cours du temps.

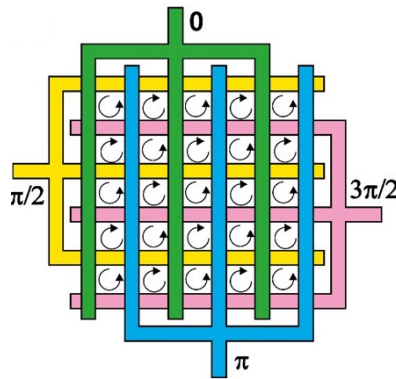


FIGURE 5.4 – Création d'un champ électrique tournant en appliquant quatre tensions sinusoïdales en quadrature [140].

Enfin, d'autres techniques de formation d'agrégats de taille plus volumineuse pourront également être explorées. On peut citer par exemple l'approche consistant à fabriquer des sphéroïdes à l'aide de la méthode de la goutte pendante [141]. Ces structures multicellulaires à trois dimensions issues de l'organisation des cellules, de leurs jonctions cellule-cellule et cellule-matrice extra cellulaire ont notamment été employées comme modèles de tumeurs dans l'étude de l'électrochimiothérapie (travaux menés à l'IPBS).

Bibliographie

- [1] David O. Carpenter Zoreh Davanipour David Gee Lennart Hardell Olle Johansson-Henry Lai Kjell Hansson Mild Amy Sage Eugene L. Sobel Zhengping Xu Guangdi Chen. Le rapport bioinitiative. [http ://www.geobiologie.be/influences-sur-la-sante/rapport-bioinitiative](http://www.geobiologie.be/influences-sur-la-sante/rapport-bioinitiative), 2007.
- [2] Nicolas Gaudin. "le circ classe les champs electromagnetiques de radiofrequences comme « peut-etre cancerogenes pour l'homme »". [http ://www.iarc.fr/fr/media-centre/pr/2011/.pdf](http://www.iarc.fr/fr/media-centre/pr/2011/.pdf), 2011.
- [3] E.J. Bond, X. Li, S.C. Hagness, and B.D. Van Veen. Microwave imaging via space-time beamforming for early detection of breast cancer. *Antennas and Propagation, IEEE Transactions on*, 51(8) :1690–1705, 2003.
- [4] MM Gebbard, E Gersing, CJ Brockhoff, Ph A Schnabel, and HJ Bretschneider. Impedance spectroscopy : a method for surveillance of ischemia tolerance of the heart. *The Thoracic and cardiovascular surgeon*, 35(01) :26–32, 2008.
- [5] Antoni Ivorra. Bioimpedance monitoring for physicians : an overview. *Centre Nacional de Microelectrònica Biomedical Applications Group*, 2003.
- [6] Herman P Schwan. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Advances in biological and medical physics*, 5 :147, 1957.
- [7] Herman P Schwan and Kenneth R Foster. Rf-field interactions with biological systems : electrical properties and biophysical mechanisms. *Proceedings of the IEEE*, 68(1) :104–113, 1980.
- [8] HP Schwan. Electrical properties of tissues and cell suspensions : mechanisms and models. In *Engineering in Medicine and Biology Society, 1994. Engineering Advances : New Opportunities for Biomedical Engineers. Proceedings of the 16th Annual International Conference of the IEEE*, pages A70–A71. IEEE, 1994.
- [9] K.R. Foster. Herman p. schwan : A scientist and pioneer in biomedical engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4(1) :1–27, 2002.
- [10] K.R. Foster and H.P. Schwan. Dielectric properties of tissues. *Handbook of biological effects of electromagnetic fields*, pages 25–102, 1996.

- [11] S. Abdalla. Low frequency dielectric properties of human blood. *NanoBioscience, IEEE Transactions on*, 10(2) :113–120, 2011.
- [12] C. Gabriel, A. Peyman, and EH Grant. Electrical conductivity of tissue at frequencies below 1 mhz. *Physics in medicine and biology*, 54(16) :4863, 2009.
- [13] A.M. Hassan, M.A. Youssif, A.M. Mazrouaa, R.M. Abou Shahba, and M.A.E. Youssif. Evaluation of the dielectric properties of grease containing copolymers and ester. *Journal of Applied Polymer Science*, 2012.
- [14] G. Qiao, W. Wang, W. Duan, F. Zheng, A.J. Sinclair, and C.R. Chatwin. Bioimpedance analysis for the characterization of breast cancer cells in suspension. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, 59(8) :2321–2329, 2012.
- [15] P. Tibayrenc, L. Preziosi-Belloy, and C. Ghommidh. On-line monitoring of dielectrical properties of yeast cells during a stress-model alcoholic fermentation. *Process Biochemistry*, 46(1) :193–201, 2011.
- [16] A. Di Biasio and C. Cametti. On the dielectric relaxation of biological cell suspensions : The effect of the membrane electrical conductivity. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 84(2) :433–441, 2011.
- [17] Nicolassandean20054pi Sandeau. *4Pi-microscopie : Applications à la localisation axiale de luminophores et à l'amélioration de la résolution latérale*. PhD thesis, Université de droit, d'économie et des sciences-Aix-Marseille III, 2005.
- [18] J.P. Thiery. Cell adhesion in cancer. *Comptes Rendus Physique*, 4(2) :289–304, 2003.
- [19] H.F. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, and J.E. Darnell. *Molecular cell biology*. WH Freeman New York, NY :, 1995.
- [20] Alexandre Saez, Marion Ghibaudo, Benoît Ladoux, Axel Buguin, and Pascal Silberzan. Les cellules vivantes répondent à la rigidité de leur substrat. *Images de la physique*, pages 94–100, 2007.
- [21] Sally A Kim, Chin-Yin Tai, Lee-Peng Mok, Eric A Mosser, and Erin M Schuman. Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell–cell junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(24) :9857–9862, 2011.
- [22] E.M. Kovacs et al. Direct cadherin-activated cell signaling a view from the plasma membrane. *The Journal of cell biology*, 160(1) :11–16, 2003.
- [23] A. Le Floc'h, A. Jalil, I. Vergnon, B.L.M. Chansac, V. Lazar, G. Bismuth, S. Chouaib, and F. Mami-Chouaib. $\alpha\epsilon\beta 7$ integrin interaction with e-cadherin promotes antitumor ctl activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *The Journal of experimental medicine*, 204(3) :559–570, 2007.
- [24] B. Felding-Habermann, S. Silletti, F. Mei, C.H. Siu, P.M. Yip, P.C. Brooks, D.A. Cheresh, T.E. O'Toole, M.H. Ginsberg, and A.M.P. Montgomery. A

- single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule 11 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins. *The Journal of cell biology*, 139(6) :1567–1581, 1997.
- [25] C.K. Miranti, J.S. Brugge, et al. Sensing the environment : a historical perspective on integrin signal transduction. *Nature Cell Biology*, 4(4) :83–90, 2002.
 - [26] C.V. Carman and T.A. Springer. Integrin avidity regulation : are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current opinion in cell biology*, 15(5) :547–556, 2003.
 - [27] EC Fear and MA Stuchly. Modeling assemblies of biological cells exposed to electric fields. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, 45(10) :1259–1271, 1998.
 - [28] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular biology of the cell*, Bruce Alberts...[et al.]. Garland Science. New York. US, 2002.
 - [29] Clair Poignard. “une introduction à la modélisation électromagnétique des cellules biologique”, 2007.
 - [30] Herbert Ackland Pohl. *Dielectrophoresis : the behavior of neutral matter in nonuniform electric fields*, volume 80. Cambridge university press Cambridge, 1978.
 - [31] Ronald Pethig, Ying Huang, Xiao-bo Wang, and Julian PH Burt. Positive and negative dielectrophoretic collection of colloidal particles using interdigitated castellated microelectrodes. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 25(5) :881, 1992.
 - [32] Joel Voldman. Electrical forces for microscale cell manipulation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8 :425–454, 2006.
 - [33] WM Arnold and U Zimmermann. Electro-rotation : development of a technique for dielectric measurements on individual cells and particles. *Journal of Electrostatics*, 21(2) :151–191, 1988.
 - [34] G Qiao, W Duan, C Chatwin, A Sinclair, and W Wang. Electrical properties of breast cancer cells from impedance measurement of cell suspensions. In *Journal of Physics : Conference Series*, volume 224, page 012081. IOP Publishing, 2010.
 - [35] Rudolf Höber. Eine methode, die elektrische leitfähigkeit im innern von zellen zu messen. *Pflüger’s Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 133(4-6) :237–253, 1910.
 - [36] Cours. “matériaux isolants”. <http://wcours.gel.ulaval.ca/2008IGEE-403.pdf>, 2008.
 - [37] MANCEAU Jean-Philippe. *Etude du phénomène de relaxation diélectrique dans les capacités Métal-Isolant-Métal*. PhD thesis, Université Joseph Fourier, 2008.

- [38] K Asami. Dielectric spectra of biological cells and tissues simulated by three-dimensional finite difference method. In *13th International Conference on Electrical Bioimpedance and the 8th Conference on Electrical Impedance Tomography*, pages 98–101. Springer, 2007.
- [39] David J Bakewell, Nuria Vergara-Irigaray, and David Holmes. Dielectrophoresis of biomolecules. *Nanotechnol Nanomed*, 1 :1003, 2013.
- [40] Julie Laforet-Ast. *Caractérisation de microparticules par méthodes diélectrophorétiques : applications aux cellules biologiques*. PhD thesis, Ecole Centrale de Lyon, 2010.
- [41] T.B. Jones. *Electromechanics of particles*. Cambridge Univ Pr, 1995.
- [42] A. Irimajiri, T. Hanai, and A. Inouye. A dielectric theory of multi-stratified shell model with its application to a lymphoma cell. *Journal of Theoretical Biology*, 78(2) :251–269, 1979.
- [43] X.B. Wang, MP Hughes, Y. Huang, FF Becker, and PRC Gascoyne. Non-uniform spatial distributions of both the magnitude and phase of ac electric fields determine dielectrophoretic forces. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1243(2) :185–194, 1995.
- [44] M.P. Hughes. *Nanoelectromechanics in engineering and biology*. CRC, 2003.
- [45] T.L. Mahaworasilpa, H.G.L. Coster, and E.P. George. Forces on biological cells due to applied alternating (ac) electric fields. i. dielectrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1193(1) :118–126, 1994.
- [46] PRC Gascoyne, FF Becker, and X.B. Wang. Numerical analysis of the influence of experimental conditions on the accuracy of dielectric parameters derived from electrorotation measurements. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 36(2) :115–125, 1995.
- [47] J Gimsa, R Glaser, and G Fuhr. Theory and application of the rotation of biological cells in rotating electric fields (electro-rotation). *Physical characterization of biological cells*, pages 295–323, 1991.
- [48] Eberhard Gersing. Impedance spectroscopy on living tissue for determination of the state of organs. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 45(2) :145–149, 1998.
- [49] Tim Süsselbeck, Hagen Thielecke, Julia Köchlin, Sungbo Cho, Ines Weinschenk, Jürgen Metz, Martin Borggreffe, and Karl K Haase. Intravascular electric impedance spectroscopy of atherosclerotic lesions using a new impedance catheter system. *Basic research in cardiology*, 100(5) :446–452, 2005.
- [50] Peter Aberg, Ingrid Nicander, Johan Hansson, Paul Geladi, Ulf Holmgren, and Stig Ollmar. Skin cancer identification using multifrequency electrical impedance-a potential screening tool. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, 51(12) :2097–2102, 2004.

- [51] A Soley, M Lecina, X Gámez, JJ Cairo, P Riu, X Rosell, R Bragos, and F Godia. On-line monitoring of yeast cell growth by impedance spectroscopy. *Journal of biotechnology*, 118(4) :398–405, 2005.
- [52] Daniel R Merrill, Marom Bikson, and John GR Jefferys. Electrical stimulation of excitable tissue : design of efficacious and safe protocols. *Journal of neuroscience methods*, 141(2) :171–198, 2005.
- [53] Shady Gawad, L Schild, and Ph Renaud. Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing. *Lab Chip*, 1(1) :76–82, 2001.
- [54] H Edward Ayliffe, A Bruno Frazier, and RD Rabbitt. Electric impedance spectroscopy using microchannels with integrated metal electrodes. *Microelectromechanical Systems, Journal of*, 8(1) :50–57, 1999.
- [55] Tao Sun, Nicolas G Green, Shady Gawad, and Hywel Morgan. Analytical electric field and sensitivity analysis for two microfluidic impedance cytometer designs. *Iet Nanobiotechnology*, 1(5) :69–79, 2007.
- [56] Tao Sun, Cees van Berkel, Nicolas G Green, and Hywel Morgan. Digital signal processing methods for impedance microfluidic cytometry. *Microfluidics and nanofluidics*, 6(2) :179–187, 2009.
- [57] Lisen Wang, Lisa Flanagan, and Abraham P Lee. Side-wall vertical electrodes for lateral field microfluidic applications. *Microelectromechanical Systems, Journal of*, 16(2) :454–461, 2007.
- [58] Hong-Lei Gou, Xian-Bo Zhang, Ning Bao, Jing-Juan Xu, Xing-Hua Xia, and Hong-Yuan Chen. Label-free electrical discrimination of cells at normal, apoptotic and necrotic status with a microfluidic device. *Journal of Chromatography A*, 1218(33) :5725–5729, 2011.
- [59] Christelle Terrier. Jonctions et adhérence cellulaire. <http://slideplayer.fr/slide/514401/>.
- [60] Cours. Adhérence cellulaire. <http://http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/adherence-cellulaire.html>.
- [61] C.M. Niessen and B.M. Gumbiner. Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *The Journal of cell biology*, 156(2) :389, 2002.
- [62] Cours. Le rôle des molécules d’adhérence dans la cohésion tissulaire. http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.103.b3/content/cours04.htm.
- [63] L. Zhao, L. Fan, X. Zhang, M. Zhu, and W. Tan. The role of microenvironment in aggregation of the 293-human embryonic kidney cells. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 24(5) :796–799, 2007.

- [64] L. Nicolas, N. Burais, F. Buret, O. Fabregue, L. Krahenbuhl, A. Nicolas, C. Poignard, R. Scoretti, N. Siauve, and C. Vollaie. Interactions between electromagnetic field and biological tissues : Questions, some answers and future trends. *International Compumag Society Newsletter*, 10(2) :4–9, 2003.
- [65] Gerhard Schwarz. A theory of the low-frequency dielectric dispersion of colloidal particles in electrolyte solution1, 2. *The Journal of Physical Chemistry*, 66(12) :2636–2642, 1962.
- [66] M Schäfer, C Schlegel, H-J Kirlum, E Gersing, and MM Gebhard. Monitoring of damage to skeletal muscle tissues caused by ischemia. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 45(2) :151–155, 1998.
- [67] N De Jonge, DB Peckys, GJ Kremers, and DW Piston. Electron microscopy of whole cells in liquid with nanometer resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7) :2159–2164, 2009.
- [68] Michael A Beardslee, Deborah L Lerner, Peter N Tadros, James G Laing, Eric C Beyer, Kathryn A Yamada, André G Kléber, Richard B Schuessler, and Jeffrey E Saffitz. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circulation research*, 87(8) :656–662, 2000.
- [69] Laurent Bernard. *Caractérisation électrique des tissus biologiques et calcul des phénomènes induits dans le corps humain par des champs électromagnétiques de fréquence inférieure au GHz*. PhD thesis, Ecole Centrale de Lyon, 2007.
- [70] Aude Silve. *Nouveaux dispositifs pour l’application contrôlée d’impulsions électriques nanosecondes et pour la détection de leurs effets sur les cellules. Nouveaux résultats et hypothèses sur les paramètres contrôlant l’électroperméabilisation des cellules biologiques*. PhD thesis, Université Paris Sud-Paris XI, 2011.
- [71] A Ovsianikov, M Gruene, M Pflaum, L Koch, F Maiorana, M Wilhelmi, A Haverich, and B Chichkov. Laser printing of cells into 3d scaffolds. *Biofabrication*, 2(1) :014104, 2010.
- [72] Byung-Soo Kim and David J Mooney. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends in biotechnology*, 16(5) :224–230, 1998.
- [73] Jennifer S Liu and Zev J Gartner. Directing the assembly of spatially organized multicomponent tissues from the bottom up. *Trends in cell biology*, 22(12) :683–691, 2012.
- [74] M Nakamura, S Iwanaga, C Henmi, K Arai, and Y Nishiyama. Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. *Biofabrication*, 2(1) :014110, 2010.
- [75] Ruei-Zeng Lin, Chen-Ta Ho, Cheng-Hsien Liu, and Hwan-You Chang. Dielectrophoresis based-cell patterning for tissue engineering. *Biotechnology journal*, 1(9) :949–957, 2006.

- [76] Glauco R Souza, Jennifer R Molina, Robert M Raphael, Michael G Ozawa, Daniel J Stark, Carly S Levin, Lawrence F Bronk, Jeyarama S Ananta, Jami Mandelin, Maria-Magdalena Georgescu, et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nature nanotechnology*, 5(4) :291–296, 2010.
- [77] Anil Sebastian, Anne-Marie Buckle, and Gerard H Markx. Tissue engineering with electric fields : Immobilization of mammalian cells in multilayer aggregates using dielectrophoresis. *Biotechnology and bioengineering*, 98(3) :694–700, 2007.
- [78] Y. Huang and R. Pethig. Electrode design for negative dielectrophoresis. *Measurement Science and Technology*, 2 :1142, 1991.
- [79] M.P. Hughes. Computer-aided analysis of conditions for optimizing practical electrorotation. *Physics in medicine and biology*, 43 :3639, 1998.
- [80] Clariant. Az 5214 e image reversal photoresist.
- [81] Antonio Ramos, H Morgan, NG Green, and A Castellanos. The role of electrohydrodynamic forces in the dielectrophoretic manipulation and separation of particles. *Journal of Electrostatics*, 47(1) :71–81, 1999.
- [82] Nicolas G Green, Antonio Ramos, Antonio Gonzalez, Hywel Morgan, and Antonio Castellanos. Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. iii. observation of streamlines and numerical simulation. *Physical review E*, 66(2) :026305, 2002.
- [83] John Canny. A computational approach to edge detection. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, (6) :679–698, 1986.
- [84] A Budde, G Grümmer, and E Knippel. Electrorotation of cells and particles : an automated instrumentation. *Instrumentation science & technology*, 27(1) :59–66, 1999.
- [85] XF Zhou, JPH Burt, and R Pethig. Automatic cell electrorotation measurements : studies of the biological effects of low-frequency magnetic fields and of heat shock. *Physics in Medicine and Biology*, 43(5) :1075, 1998.
- [86] Giovanni De Gasperis, XiaoBo Wang, Jun Yang, Frederick F Becker, and Peter RC Gascoyne. Automated electrorotation : dielectric characterization of living cells by real-time motion estimation. *Measurement Science and Technology*, 9(3) :518, 1998.
- [87] Sergey N Krylov, Norman J Dovichi, et al. Single-cell analysis using capillary electrophoresis : Influence of surface support properties on cell injection into the capillary. *Electrophoresis*, 21(4) :767–773, 2000.
- [88] Miguel Sancho, Genoveva Martínez, Sagrario Muñoz, José L. Sebastián, and Ronald Pethig. Interaction between cells in dielectrophoresis and electrorotation experiments. *Biomicrofluidics*, 4(2), 2010.

- [89] Pushkar P Lele, Manish Mittal, and Eric M Furst. Anomalous particle rotation and resulting microstructure of colloids in ac electric fields. *Langmuir*, 24(22) :12842–12848, 2008.
- [90] Chr Holzapfel, J Vienken, and U Zimmermann. Rotation of cells in an alternating electric field theory and experimental proof. *The Journal of membrane biology*, 67(1) :13–26, 1982.
- [91] D. Zimmermann, M. Kiesel, U. Terpitz, A. Zhou, R. Reuss, J. Kraus, WA Schenk, E. Bamberg, and VL Sukhorukov. A combined patch-clamp and electrorotation study of the voltage-and frequency-dependent membrane capacitance caused by structurally dissimilar lipophilic anions. *Journal of Membrane Biology*, 221(2) :107–121, 2008.
- [92] Ralph Hölzel. Electrorotation of single yeast cells at frequencies between 100 hz and 1.6 ghz. *Biophysical journal*, 73(2) :1103–1109, 1997.
- [93] L.J. Gentet, G.J. Stuart, and J.D. Clements. Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. *Biophysical journal*, 79(1) :314–320, 2000.
- [94] Kanatip Ratanachoo, Peter R C. Gascoyne, and Mathuros Ruchirawat. Detection of cellular responses to toxicants by dielectrophoresis. *Biochim Biophys Acta*, 1564(2) :449–458, Aug 2002.
- [95] V. Berardi, C. Aiello, A. Bonincontro, and G. Risuleo. Alterations of the plasma membrane caused by murine polyomavirus proliferation : an electrorotation study. *Journal of Membrane Biology*, 229(1) :19–25, 2009.
- [96] C.H. Chuang, Y.M. Hsu, and C.C. Yeh. The effects of nanoparticles uptaken by cells on electrorotation. *Electrophoresis*, 30(9) :1449–1456, 2009.
- [97] Jun Yang, Ying Huang, Xujing Wang, Xiao-Bo Wang, Frederick F Becker, and Peter RC Gascoyne. Dielectric properties of human leukocyte subpopulations determined by electrorotation as a cell separation criterion. *Biophysical Journal*, 76(6) :3307–3314, 1999.
- [98] Peter Gascoyne, Ronald Pethig, Jutamaad Satayavivad, Frederick F Becker, and Mathuros Ruchirawat. Dielectrophoretic detection of changes in erythrocyte membranes following malarial infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1323(2) :240–252, 1997.
- [99] X. Liu, L. Zhao, Y. Wang, X. Zhang, and W.S. Tan. Effects of calcium ion on adenovirus production with high densities of hek293 cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(3) :414–420, 2010.
- [100] Gerard H Markx, Penelope A Dyda, and Ronald Pethig. Dielectrophoretic separation of bacteria using a conductivity gradient. *Journal of biotechnology*, 51(2) :175–180, 1996.
- [101] Ying Huang, Karla L Ewalt, Marcus Tirado, Robert Haigis, Anita Forster, Donald Ackley, Michael J Heller, James P O’Connel, and Michael Krihak.

- Electric manipulation of bioparticles and macromolecules on microfabricated electrodes. *Analytical chemistry*, 73(7) :1549–1559, 2001.
- [102] DF Chen, Hejun Du, and WH Li. Bioparticle separation and manipulation using dielectrophoresis. *Sensors and Actuators A : Physical*, 133(2) :329–334, 2007.
 - [103] Khashayar Khoshmanesh, Sara Baratchi, Francisco J Tovar-Lopez, Saeid Nahavandi, Donald Wlodkowic, Arnan Mitchell, and Kourosh Kalantar-zadeh. On-chip separation of lactobacillus bacteria from yeasts using dielectrophoresis. *Microfluidics and nanofluidics*, 12(1-4) :597–606, 2012.
 - [104] X-B Wang, Y Huang, JPH Burt, GH Markx, and RBUK Pethig. Selective dielectrophoretic confinement of bioparticles in potential energy wells. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 26(8) :1278, 1993.
 - [105] Hywel Morgan, Michael P Hughes, and Nicolas G Green. Separation of sub-micron bioparticles by dielectrophoresis. *Biophysical journal*, 77(1) :516–525, 1999.
 - [106] Haibo Li and Rashid Bashir. Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of *listeria* on microfabricated devices with interdigitated electrodes. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 86(2) :215–221, 2002.
 - [107] Th Schnelle, T Müller, and G Fuhr. Trapping in ac octode field cages. *Journal of Electrostatics*, 50(1) :17–29, 2000.
 - [108] Th Schnelle, T Müller, Ch Reichle, and G Fuhr. Combined dielectrophoretic field cages and laser tweezers for electrorotation. *Applied Physics B*, 70(2) :267–274, 2000.
 - [109] M Frenea, SP Faure, Bruno Le Pioufle, Ph Coquet, and H Fujita. Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis. *Materials Science and Engineering : C*, 23(5) :597–603, 2003.
 - [110] Marie Frenea-Robin. *Micromanipulation de particules par diélectrophorèse : application au rangement matriciel et au tri de cellules sur puce*. PhD thesis, 2003.
 - [111] Abel L Thangawng, Melody A Swartz, Matthew R Glucksberg, and Rodney S Ruoff. Bond–detach lithography : a method for micro/nanolithography by precision pdms patterning. *Small*, 3(1) :132–138, 2007.
 - [112] Jianhua Tong, Craig A Simmons, and Yu Sun. Precision patterning of pdms membranes and applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 18(3) :037004, 2008.
 - [113] Holger Becker and Claudia Gärtner. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis*, 21(1) :12–26, 2000.

- [114] J Garra, T Long, J Currie, T Schneider, R White, and M Paranjape. Dry etching of polydimethylsiloxane for microfluidic systems. *Journal of Vacuum Science & Technology A : Vacuum, Surfaces, and Films*, 20(3) :975–982, 2002.
- [115] Janelle R Anderson, Daniel T Chiu, Hongkai Wu, Olivier JA Schueller, and George M Whitesides. Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 21 :27–40, 2000.
- [116] Todd Thorsen, Sebastian J Maerkl, and Stephen R Quake. Microfluidic large-scale integration. *Science*, 298(5593) :580–584, 2002.
- [117] Samia Menad, Amal El-Gaddar, Naoufel Haddour, Sylvain Toru, Mathieu Brun, François Buret, and Marie Frenea-Robin. From bipolar to quadrupolar electrode structures : an application of bond-detach lithography for dielectrophoretic particle assembly. *Langmuir*, 2014.
- [118] Kee Suk Ryu, Xuefeng Wang, Kashan Shaikh, and Chang Liu. A method for precision patterning of silicone elastomer and its applications. *Microelectromechanical Systems, Journal of*, 13(4) :568–575, 2004.
- [119] GabrielWeb. IFAC, Institute For Applied Physics. <http://niremif.ifac.cnr.it/tissprop/>.
- [120] Sverre Grimnes, Oslo Rikshospitalet, and Norway Herman P Schwan. Interface phenomena and dielectric properties of biological tissue. *Encyclopedia of surface and colloid science*, 20 :2643–2653, 2002.
- [121] Mathieu Brun. *Électrodes nanocomposites pour applications en microfluidique*. PhD thesis, Université Claude Bernard-Lyon I, 2011.
- [122] Mathieu Brun, Jean-François Chateaux, Anne-Laure Deman, Patrick Pittet, and Rosaria Ferrigno. Nanocomposite carbon-pdms material for chip-based electrochemical detection. *Electroanalysis*, 23(2) :321–324, 2011.
- [123] Ryan W Going, Brandon L Conover, and Michael J Escuti. Electrostatic force and torque description of generalized spheroidal particles in optical landscapes. In *NanoScience+ Engineering*, pages 703826–703826. International Society for Optics and Photonics, 2008.
- [124] François Buret, Nicolas Faure, Laurent Nicolas, Ronan Perrussel, Clair Poinard, et al. Numerical studies on the effect of electric pulses on an egg-shaped cell with a spherical nucleus. *IEEE*, 2010.
- [125] Kanokkan Maswiwat, Moritz Holtappels, and Jan Gimsa. On the field distribution in electrorotation chambersinfluence of electrode shape. *Electrochimica acta*, 51(24) :5215–5220, 2006.
- [126] Thomas B Jones. Basic theory of dielectrophoresis and electrorotation. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE*, 22(6) :33–42, 2003.
- [127] AA Pilla, PR Nasser, and JJ Kaufman. Gap junction impedance, tissue dielectrics and thermal noise limits for electromagnetic field bioeffects. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 35(1) :63–69, 1994.

- [128] Pedro Henrique Cury Camargo, Kestur Gundappa Satyanarayana, and Fernando Wypych. Nanocomposites : synthesis, structure, properties and new application opportunities. *Materials Research*, 12(1) :1–39, 2009.
- [129] Sumio Iijima et al. Helical microtubules of graphitic carbon. *nature*, 354(6348) :56–58, 1991.
- [130] Karen I Winey and Richard A Vaia. Polymer nanocomposites. *MRS bulletin*, 32(04) :314–322, 2007.
- [131] Tapas Kuilla, Sambhu Bhadra, Dahu Yao, Nam Hoon Kim, Saswata Bose, and Joong Hee Lee. Recent advances in graphene based polymer composites. *Progress in Polymer Science*, 35(11) :1350–1375, 2010.
- [132] Erik T Thostenson, Zhifeng Ren, and Tsu-Wei Chou. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites : a review. *Composites science and technology*, 61(13) :1899–1912, 2001.
- [133] E Hammel, X Tang, M Trampert, T Schmitt, K Mauthner, A Eder, and P Pötschke. Carbon nanofibers for composite applications. *Carbon*, 42(5) :1153–1158, 2004.
- [134] M Endo, YA Kim, T Hayashi, K Nishimura, T Matusita, K Miyashita, and MS Dresselhaus. Vapor-grown carbon fibers (vgcfs) : basic properties and their battery applications. *Carbon*, 39(9) :1287–1297, 2001.
- [135] Gary G Tibbetts, Max L Lake, Karla L Strong, and Brian P Rice. A review of the fabrication and properties of vapor-grown carbon nanofiber/polymer composites. *Composites Science and Technology*, 67(7) :1709–1718, 2007.
- [136] P Cardoso, D Klosterman, JA Covas, FWJ van Hattum, and S Lanceros-Mendez. Quantitative evaluation of the dispersion achievable using different preparation methods and dc electrical conductivity of vapor grown carbon nanofiber/epoxy composites. *Polymer Testing*, 31 :697–704, 2012.
- [137] Eric L Crump. Economic impact analysis for the proposed carbon black manufacturing neshap. *US Environmental Protection Agency. Office of Air Quality Planning and Standards. Innovative Strategies and Economics Group. Durham : US Environmental Protection Agency (EPA)*, 2000.
- [138] K Stephan, P Pittet, L Renaud, P Kleimann, P Morin, N Ouaini, and R Ferrigno. Fast prototyping using a dry film photoresist : microfabrication of soft-lithography masters for microfluidic structures. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17(10) :N69, 2007.
- [139] Masashi Yamamoto, Tomoyuki Yasukawa, Masato Suzuki, Satoshi Kosuge, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, and Fumio Mizutani. Patterning with particles using three-dimensional interdigitated array electrodes with negative dielectrophoresis and its application to simple immunosensing. *Electrochimica Acta*, 82 :35–42, 2012.

- [140] Kosuke Ino, Atsuko Ishida, Kumi Y Inoue, Masato Suzuki, Masahiro Koide, Tomoyuki Yasukawa, Hitoshi Shiku, and Tomokazu Matsue. Electrorotation chip consisting of three-dimensional interdigitated array electrodes. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 153(2) :468–473, 2011.
- [141] L Chopinet, L Wasungu, and M-P Rols. First explanations for differences in electrotransfection efficiency in vitro and in vivo using spheroid model. *International journal of pharmaceutics*, 423(1) :7–15, 2012.

Titre :**Étude de comportement électrique des cellules isolées HEK293 et de leurs agrégats****Mots clés :**

champs électromagnétiques ; électrorotation ; cellules HEK; agrégats de cellules.

Title: *Study of electrical behavior of isolated HEK 293 cells and their aggregates***Keywords:** *electromagnetic fields ; electrorotation ; HEK cells ; cell aggregates..***Résumé :**

Le travail rapporté dans ce manuscrit s'inscrit dans la perspective de mieux comprendre les propriétés électriques des tissus biologiques dans la gamme de fréquence allant de 10 kHz à 100 MHz. La connaissance de ces propriétés est essentielle pour évaluer les effets du champ électromagnétique sur le corps humain en cas d'exposition involontaire mais aussi pour diagnostiquer un changement physiologique quand le tissu est exposé volontairement. De nombreux travaux ont été effectués pour mesurer les propriétés électriques des différents tissus mais le comportement électrique relevé n'est pas toujours bien compris en raison de la complexité de la structure du tissu. De plus, on constate une grande variabilité dans les données rapportées dans la littérature. Pour mieux appréhender le comportement électrique du tissu, la démarche originale proposée dans ce manuscrit consiste à partir de l'échelle de la cellule. Ainsi la première partie du manuscrit est consacrée à la caractérisation électrique de cellule humaines de type HEK (Human Embryonic Kidney) par électrorotation. La mise en oeuvre de cette technique a permis d'extraire les propriétés électrique de la membrane et du cytoplasme des cellules HEK. La deuxième partie du manuscrit se focalise sur la création d'agrégats de cellules à partir de cellules HEK isolées. Deux techniques ont été essayées. La première s'appuie sur la nature des jonctions intercellulaires. Même si elle donne des résultats, cette approche n'est pas satisfaisante dans la mesure où on ne peut contrôler ni la forme ni la taille des agrégats. L'autre technique consiste à utiliser un champ électrique pour manipuler les cellules par diélectrophorèse. Un microsysteme a été conçu à cet effet avec un réseau d'électrodes quadripolaires. On a ainsi pu obtenir des agrégats permanents de cellules HEK ayant une taille et une forme contrôlée. La dernière partie du manuscrit porte sur l'étude du comportement électrique des agrégats de cellules par le biais de simulations numériques de spectres d'électrorotation. La comparaison du comportement électrique d'une cellule isolée et celui d'un agrégat de cellules montre que le milieu extra cellulaire influe fortement sur la réponse électrique de l'agrégat ; la différence de taille entre les cellules de même que la présence de jonctions intercellulaires ne semblent pas avoir un impact significatif. Ces résultats de simulation devront être appuyés par des études expérimentales..

Direction de Recherche :

Dr. Laurent Krähenbühl, directeur de recherche au CNRS

Laurent.krahenbuhl@ec-lyon.fr

Laboratoire Ampère (CNRS UMR5005)<http://www.ampere-lab.fr>**Ecole Centrale de Lyon**

36 avenue Guy de Collongue

69134 Ecully CEDEX (France)